

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern für populations-
genetische Untersuchungen bei *Leishmania infantum*“**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Hertweck

aus Karlsruhe

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Presber
2. Prof. Dr. Heidrun Moll
3. Prof. Dr. Christian Bogdan

Datum der Promotion: 19. 7. 2004

Abstract

Leishmania infantum ist für einen beträchtlichen Teil der viszerale Leishmaniosen weltweit verantwortlich. Die allgemein anerkannte Methode zur Klassifizierung wie auch zur Identifizierung von Leishmanien ist die Isoenzymanalyse. Speziell für *L. infantum* reicht das Auflösungsvermögen dieser Methodik allerdings nicht aus, da mehr als 80 % der analysierten Stämme dem prädominanten Zymodem MON-1 angehören. In dieser Arbeit wurden Primerpaare für die Amplifikation von 15 unabhängigen Mikrosatelliten entwickelt. Das verwendete Protokoll zur Erstellung einer angereicherten genetischen Bibliothek ist leicht für andere Leishmanienarten adaptierbar. Die Marker wurden an 13 Stämmen des *L. donovani*-Komplexes getestet mit Schwerpunkt auf *L. infantum* MON-1. Die berechneten Dendrogramme entsprachen weitestgehend den Ergebnissen früherer, auf genotypischen Methoden basierenden phylogenetischen Studien. In Abhängigkeit von Zymodem und Spezies wurden unterschiedlich hohe Anteile heterogener Allele beobachtet.

Das ist der erste Satz von unabhängigen Mikrosatellitenmarkern entwickelt speziell für *L. infantum*, der groß genug für phylogenetische Anwendungen ist. Für jedem untersuchten Stamm wurde ein eigener Multilocus-Genotyp beobachtet, was diese Methode zu einem wichtigen Werkzeug für epidemiologische und populationsgenetische Untersuchungen macht.

Schlagwörter: *Leishmania donovani*-Komplex, *Leishmania infantum*, Mikrosatellit, Populationsgenetik

Abstract

Leishmania infantum is responsible for a large proportion of visceral leishmaniasis all over the world. The universally accepted standard method for characterizing and identification of *Leishmania* is the isoenzyme analysis. Especially for *L. infantum*, this procedure lacks of discriminative power because the predominant zymodeme MON-1 is represented by more than 80 % of the analysed isolates. In this study, PCR assays amplifying 15 independent microsatellites were developed using a method to create highly enriched libraries that can easily be adapted for other species of *Leishmania*. The panel of markers was tested for 13 strains of the *L. donovani* complex with main emphasis on *L. infantum* MON-1. The calculated dendrograms corresponded to the results of former phylogenetic investigations based on genotypic methods. Depending of zymodeme and species, different degrees of allelic heterozygosity were observed. This is the first set of independent microsatellite markers especially developed for *L. infantum*, which is large enough for phylogenetic applications. An unique multi locus genotype is produced for each analysed isolate what makes this approach to a powerful tool for epidemiological and population genetic investigations.

Keywords: *Leishmania donovani* complex, *Leishmania infantum*, microsatellite, population genetics

Inhalt

Abbildungen, Tabellen	III
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Methoden zur Differenzierung von Spezies und Subspezies	3
1.2 Variable Mikrosatellitensequenzen als epidemiologische Marker	6
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	8
2 Material und Methoden	
2.1 Präparation der DNS	11
2.2 Erstellen einer mit Mikrosatelliten angereicherten Genbibliothek	12
2.2.1 Präparation des Adaptors	12
2.2.2 Verdau und Adaptorligation	12
2.2.3 Größenselektion der Fragmente und Probe-PCR	13
2.2.4 Anreicherung von Mikrosatelliten enthaltenden Fragmenten	15
2.2.5 PCR, Testelektrophorese und Ligation in p-Drive-Vector	16
2.2.6 Präparation der Agarplatten	17
2.2.7 Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien	17
2.3 Screening der Kolonien nach (GT) ₁₀ -positiven Klonen und Aufbereitung zur Sequenzierung	18
2.4 Design von Primern für die Amplifizierung spezifischer Mikrosatelliten- marker	19
2.5 Optimierung der PCR-Bedingungen für die ermittelten Primerpaare	19
2.6 Testung der Mikrosatellitenmarker auf Längenpolymorphismen	20
2.7 Geräte und Dienstleistungen	22

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung einer CA/GT-Mikrosatelliten-Bibliothek	23
3.2 Sequenzauswertung und Primerdesign	26
3.3 Nachweis von Polymorphismen in den Mikrosatellitenregionen	28
3.4 Bestimmung der genetischen Verwandtschaft basierend auf der Analyse der Mikrosatellitenvariationen	33

4 Diskussion 35**5 Zusammenfassung** 42**6 Literatur** 44

Erklärung an Eides statt	a
--------------------------	---

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Taxonomie von Leishmania	2
Abb. 2	Angenommener Mutationsmechanismus bei Mikrosatelliten	7
Abb. 3	Der Adaptor und seine Bestandteile	13
Abb. 4	Gelelektrophorese nach Kontroll-PCR	14
Abb. 5	Fließschema: Anlegen der genetischen Bibliothek	25
Abb. 6	Gelelektrophorese nach Screening-PCR	26
Abb. 7	Deletion und Punktmutation bei Li71-41	28
Abb. 8	Polyacrylamidgelelektrophorese	29
Abb. 9	Gelelektrophorese mit MetaPhor-Agarose	29
Abb. 10	Dendrogramm (<i>Ds</i> , <i>Ddm</i> / UPGMA)	34
Tab. 1	Untersuchte Stämme	20
Tab. 2	Effizienz der Anreicherung, Redundanzen	24
Tab. 3	Entwickelte Primerpaare	27
Tab. 4	Fragmentlängen (je Stamm, Locus)	30
Tab. 5	Anzahl der Repeats (je Stamm, Locus)	31

Abkürzungen

A

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat

B

BDH	Bidestilled H ₂ O
BLAST	Basic local alignment search tool
Bp	Basenpaar(e)

C

C	Cytosin
Chr.	Chromosom
CL	Kutane Leishmaniose

D

<i>d.</i>	<i>donovani</i>
<i>D1</i>	Average square distance
DCL	Disseminierte kutane Leishmaniose
<i>Ddm</i>	Delta mu genetic distance
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
<i>DpS</i>	Proportion of shared alleles
<i>Ds</i>	Nei's standard distance

E

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

G

g	Gramm
G	Guanin

H

h	Stunde
HIV	Human immunodeficiency virus

I

ITS	Internal transcribed spacer
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

K

kDNS	Kinetoplastid-DNS
------	-------------------

L

l	Liter
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LB	Luria Broth
<i>L. d.</i>	<i>Leishmania donovani</i>
λ	Wellenlänge

M

m-	milli
M	molar
MCL	mukokutane Leishmaniose
min	Minute
MLEE	Multilocus enzyme electro- phoresis
MMR	Missmatch repair
μ-	mikro

N

n-	nano
n	Anzahl der untersuchten Werte
NJ	Neighbour joining

P

p-	pico
P	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamidgelelektropho- rese
PCR	Polymerase chain reaction
pH	$-\log [H^+]$
PKDL	Post-Kala Azar-kutane Leishmaniose

R

$r_{S,B}$	Rangkorrelationskoeffizient mit Bindungsberücksichtigung
RFLP	Restriktionsfragmentlängen- polymorphismus
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute

S

s	Sekunde
SCAR	Sequence-confirmed amplified region
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
ssu-rRNS	„Small single-unit“ ribosomale RNS
STR	Short tandem repeat

T

T	Thymin
T_A	Annealingtemperatur
T_{hyb}	Hybridisierungstemperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)amino- methan

U

U	Uracil (im Zusammenhang mit DNS-Sequenzen)
U	Unit (im Zusammenhang mit Enzymkonzentrationen)
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
UV	ultraviolett

V

V	Volt
VL	Viszerale Leishmaniose
Vol	Volumen

W

W	Watt
---	------

X

X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosidase
-------	--

Y

Y	Thymin oder Cytosin
---	---------------------

1 Einleitung

Leishmaniosen sind parasitäre Erkrankungen, verursacht durch protozoische Flagellaten, die von Sandmücken der Genera *Phlebotomus* (Alte Welt) und *Lutzomyia* (Neue Welt) übertragen werden (Killick-Kendrick 1990). In 88 Ländern finden sich Endemiegebiete. Etwa 350 Millionen Menschen, vor allem in unterentwickelten Ländern, sind durch die Krankheit bedroht, wobei mit 1,5 bis 2 Millionen Neuinfektionen pro Jahr gerechnet wird (Herwaldt 1999). Leishmanien sind dimorphe Protozoen, die sich in zwei unterschiedlichen morphologischen Stadien präsentieren: Die Promastigote ist spindelförmig mit zentralem Nukleus, einem Kinetoplasten sowie einem anterioren Flagellum; sie kommen im Intestinaltrakt des Vektors und in der Kultur vor. Die obligat intrazelluläre Amastigote ist rund bis oval und ohne externes Flagellum; sie vermehrt sich in den Makrophagen und Monozyten des Säugetierwirts (Ashford 2000, Wiese 2003).

In Abhängigkeit von Immunkompetenz und genetischer Disposition des Wirtes sowie Spezies und Virulenz des Parasiten kommt es zu sehr unterschiedlichen klinischen Bildern, von der selbstlimitierenden lokalen kutanen Leishmaniose (Orientbeule, CL) über disseminierte (DCL) oder mukokutane Formen (Espundia, MCL) bis hin zur viszeralen Leishmaniose (Kalar Azar, VL), die unbehandelt in aller Regel fatal verläuft, sowie deren Spätform, der Post-Kalar Azar-dermalen Leishmaniose (PKDL) (Karplus 2002).

Leishmania gehört zur Ordnung *Kinetoplastida* und zur Familie *Trypanosomatidae*. Man unterscheidet die zwei Untergattungen *Leishmania* und *Viannia* sowie Komplexe, die verschiedene Spezies zusammenfassen (Abb. 1). Zur Zeit sind 30 Spezies bekannt, von denen 21 Erkrankungen beim Menschen verursachen (Ashford 2000). Man unterteilt grob in viszerotrope (*L. donovani*-Komplex) und dermatotrope Leishmaniaspezies (alle übrigen)(Ashford 2000). Infektionen mit dermatotropen Stämmen gehen meist mit lokalen kutanen Läsionen (CL) einher. Einige Spezies wie *L. aethiopica*, *L. amazonensis* und *L. mexicana* führen unter speziellen immunologischen Voraussetzungen von Seiten des Wirts zu disseminierter kutaner Leishmaniose (DCL)(Velasco 1989). Eine

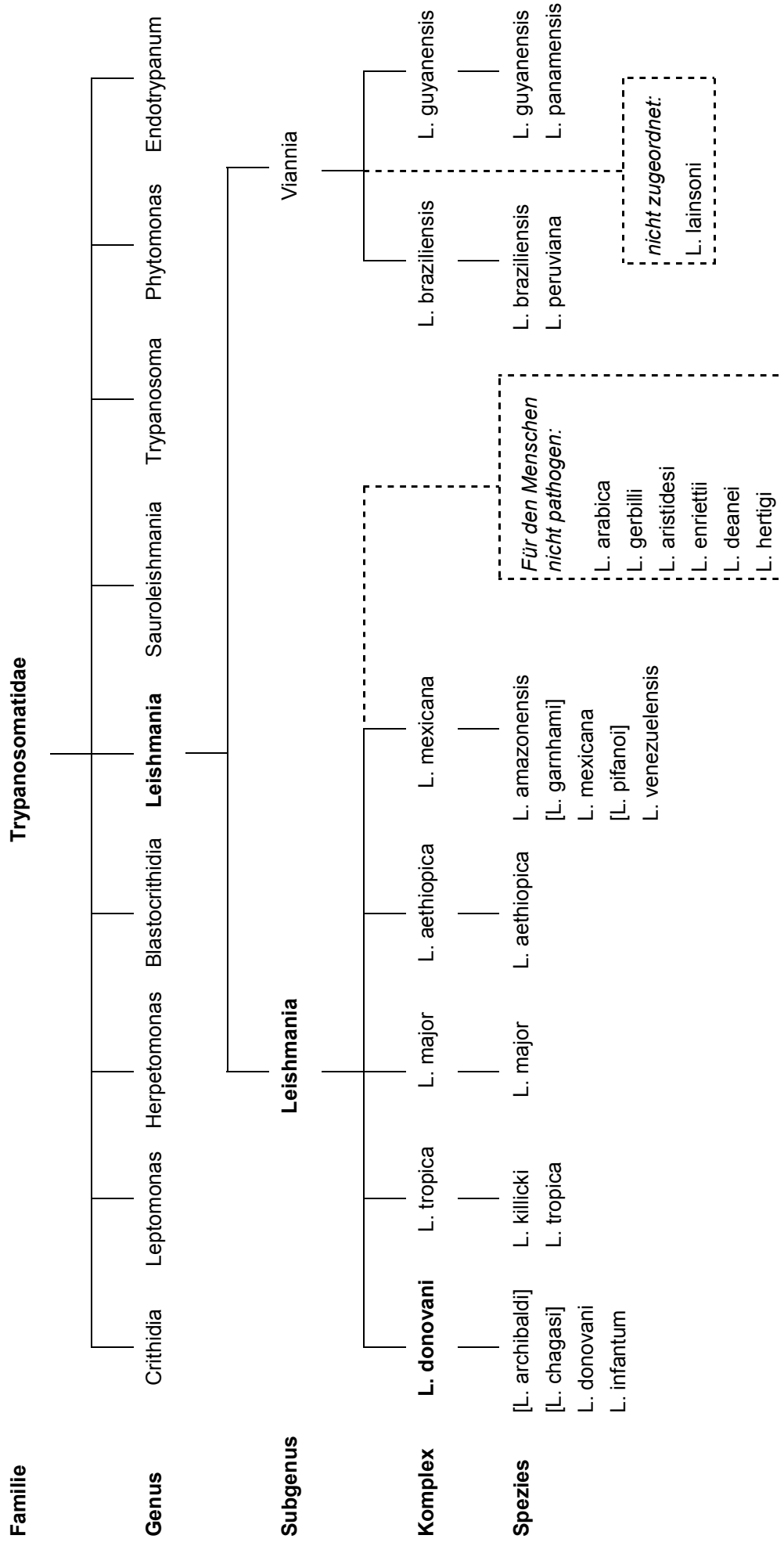


Abb. 1: Taxonomie von Leishmania

Absiedelung der Erreger in die nasopharyngealen Schleimhäute nach vorangegangener lokalisierter kutaner Läsion (MCL) ist für *L. braziliensis* und seltener für *L. panamensis* beschrieben (Corredor 1990). Es gibt zahlreiche Ausnahmen zu dieser Einteilung, insbesondere seit der Ausbreitung des HI-Virus in Leishmaniose-Endemiegebieten (Pratlong 1995). So treten bei Patienten mit HIV/Leishmania-Koinfektion selten kutane Läsionen auf. Hier kommen vor allem disseminierte Formen vor, die durch *L. infantum* (Jimenez 1991), *L. major* (Gillis 1995) und *L. braziliensis* (Rodrigues Coura 1987) hervorgerufen werden. In der Regel führt eine Infektion mit dermatotropen Spezies beim Immunsuprimierten gleich zu einer VL ohne vorheriger kutaner Läsion (Pratlong 1995). Das ätiologische Agens der viszerale Leishmaniose wird als Gruppe von Spezies im *Leishmania donovani*-Komplex zusammengefasst. Dieser besteht aus *L. donovani* Ross 1903, *L. infantum* Nicolle 1908, *L. chagasi* Cunha, Chagas 1937 und *L. archibaldi* Castellani, Chalmers 1919. Taxonomische Untersuchungen haben die Differenzierung zwischen *L. infantum* und *L. donovani* mit Hilfe der Isoenzymelektrophorese bestätigt (Rioux 1990). Im Gegensatz dazu ließ sich mit keiner Methode der taxonomischen Diskriminierung ein Unterschied zwischen *L. infantum* und *L. chagasi* finden, weswegen diese Spezies als identisch betrachtet werden, und deren Unterteilung nach rein geografischen Gesichtspunkten vorgenommen wird (*L. chagasi*: ‚Neue Welt‘ (Lateinamerika); *L. infantum*: ‚Alte Welt‘) (Mauricio 2000). Die Existenz einer dritten Spezies innerhalb des *L. donovani*-Komplexes, *L. archibaldi*, ist umstritten. Ebenfalls unklar ist das Verhältnis afrikanischer *L. donovani*-Arten zu denen aus Indien. Prinzipiell finden sich innerhalb der Spezies *L. donovani* sensu stricto sehr viel mehr genetische Unterschiede als innerhalb der Spezies *L. d. infantum*; es zeichneten sich in der Vergangenheit mehrere genotypische Subspezies von *L. d. donovani* ab, die offensichtlich in ihrer Taxonomie weitgehend ihrer geografischen Verbreitung entsprechen (Eisenberger 1999, Mauricio 2001, El Tai 2001).

1.1 Methoden zur Differenzierung von Spezies und Subspezies

Während die Differenzierung von Spezies oder Spezieskomplexen für Fragen der Diagnose, Prognose und Therapie meist ausreicht, erfordern populationsgenetische und epidemiologische Fragestellungen eine weitere Unterteilung in Subspezies. Weder

die Mikroskopie mit Giemsa-Färbung noch die Kultivierung von Promastigoten trägt zur Speziesbestimmung bei, da sich die verschiedenen Leishmanienspezies morphologisch nicht voneinander unterscheiden lassen (Herwaldt 1999). Lumsden schlug hierzu eine Unterteilung zwischen extrinsischen und intrinsischen Kriterien vor: Extrinsische Kriterien beinhalten das klinische Bild, die geografische Verteilung und das Verhalten des Erregers in Kultur, im Vektor und in Versuchstieren; intrinsische Kriterien umfassen immunologische, biochemische und molekularbiologische Aspekte (Lumsden 1974). Bis vor kurzer Zeit wurde für medizinische Zwecke eine Klassifizierung der Erreger hauptsächlich an extrinsischen Kriterien festgemacht. Durch zunehmenden Reiseverkehr und klimatische Veränderungen treten Erkrankungen mehr und mehr in Nichtendemiegebieten auf (Yoshida 1990, Ashford 2000). Zum Teil identische Krankheitsbilder durch unterschiedliche Leishmanienkomplexe macht die Speziesdifferenzierung an Hand dieser Kriterien ebenso schwierig wie die atypischen Verläufe bei Immunsuppression des Wirts (Pratlong 1995). Des weiteren sind Regionen beschrieben, in denen mehr als eine Leishmanienspezies endemisch ist, was eine eindeutige Zuordnung zumindest geografisch unmöglich macht. So finden sich in Nordafrika sowohl *L. infantum* als auch *L. major* und *L. tropica*. Im östlichen Afrika wie auch im Mittleren Osten werden Regionen beschrieben, in denen diese drei Spezies zusammen mit *L. donovani* auftreten können (Desjeux 2001, Oskam 1998).

Zur Differenzierung zwischen wie auch innerhalb verschiedener Leishmanienspezies sind eine ganze Reihe mehr oder minder effizienter Methoden entwickelt worden. Diese umfassen unter anderem die Analyse von Isoenzymmustern (Rioux 1985), serologische Analysemethoden mittels monoklonaler Antikörper (Grimaldi 1987), chromosomale Polymorphismen (Dujardin 1995 a), die PCR-Amplifikation von Kinetoplasten-Minicircle-DNS (de Bruijn 1992), das sogenannte ‚PCR-Fingerprinting‘ (Schönian 1996), die Untersuchung von spezifischen PCR-Amplifikaten unter anderem durch die Analyse von Fragmentlänge (‚Amplified fragment length polymorphism‘, AFLP), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) oder ‚Single-strand conformation polymorphism‘ (SSCP) (Orita 1989) verschiedener ‚Multi-copy‘-Zielsequenzen (Mini-Exon(spliced leader-RNS)-Gen (Fernandes 1994, Harris 1998), gp63-Region (Mauricio 2001), ssu-rRNS-Region (van Eys 1992), Cysteinproteinase B (Dujardin, in Press) und ‚Internal transcribed spacer‘(ITS)-Region (Cupolillo 1995)) und die Analyse von Mikrosatellitenlängenpolymorphismen (Rossi 1994, Russel 1999, Bulle 2002).

Goldstandard für Leishmaniendifferenzierung in Spezies und Subspezies, in sogenannte ‚Zymodeme‘, ist derzeit die Isoenzymanalyse („Multilocus isoenzyme electrophoresis“ (MLEE)). Sie setzt die erfolgreiche Kultivierung des Erregers voraus und ist nur in Speziallabors durchführbar. Der enorme Arbeits- und Zeitaufwand macht eine Analyse großer Probenzahlen unmöglich. Ein weiteres Problem ist auch, dass die MLEE einen Phänotyp charakterisiert. So bleiben Substitutionen einzelner Basenpaare, sofern sich die kodierte Aminosäure nicht ändert (sogenannte ‚synonymous sites‘), unbemerkt; des weiteren werden Veränderungen nicht exprimierter Strukturen ebenso wenig erkannt wie Mutationen in nicht kodierenden Bereichen. Posttranslationale Modifikationen dagegen können, zum Beispiel durch veränderte Umweltbedingungen, während der Kultivierung die Elektrophoresemobilität eines Enzyms trotz identischen Genotyps verändern. Nur Mutationen, die auf die Aminosäuresequenz der kodierten Enzyme Einfluss nehmen („nonsynonymous sites“), unterliegen der Selektion, was die Eignung der MLEE zu taxonomischen Untersuchungen einschränkt. So korreliert die Zymodemeinteilung nicht mit genotypisch vorgenommenen Differenzierungen von Subspezies (Oskam 1998, Schönian 2001). Eine Alternative hierzu ist die PCR-RFLP-Analyse der ITS-Region (Cupolillo 1995), mit der auf einfache Weise die Speziesbestimmung vorgenommen werden kann. Eine Unterteilung in Subspezies ist aber nur sehr eingeschränkt möglich. Weder die Karyotypisierung noch die äußerst sensitiven PCR-Methoden zur Amplifikation von Minicircle-kDNS, mit der Stämme sogenannten ‚Schizodemen‘ zugeordnet werden, können zuverlässig zur Differenzierung innerhalb einer Spezies beitragen, da sie schlecht reproduzierbare Ergebnisse liefern (Kebede 1999, Guerbouj 2001, Noyes 1998). Verfahren zur Differenzierung des Genotyps auf Basis einer Amplifikation von Parasiten-DNS direkt aus dem Gesamtgenom haben den entscheidenden Vorteil, dass eine Kultivierung der Parasiten nicht notwendig ist. Ausnahme bildet das PCR-Fingerprinting, das mit unspezifischen Einzelprimern durchgeführt wird, denn diese amplifizieren auch die DNS anderer Herkunft wie beispielsweise humane DNS. So überlagern die Banden eventueller DNS-Kontaminationen das spezifische Muster der Leishmanien-DNS, was dazu führt, dass dieses nicht zu interpretieren ist (Noyes 1996).

Die MLEE hat gezeigt, dass im mediterranen Becken das Zymodem MON-1 über 80 Prozent der *L. infantum*-Stämme ausmacht (Moreno 1986, Pratlong 1995), was populationsgenetische wie auch epidemiologische Untersuchungen unmöglich macht (Bulle

2002). Durch Amplifikation und anschließende SSCP- oder RFLP-Analyse verschiedener ‚Multi-copy‘-Gene, wie Cysteinproteinase B-Gen (Quispe, in Press), Mini-Exon-Gen (Harris 1998) und gp63-Region (Mauricio 2001), ist einer Differenzierung innerhalb dieses Zymodems möglich. Die Analyse variabler Mikrosatellitensequenzen stellt eine vielversprechende Alternative zu dieser Methode dar (Russel 1999, Jamjoom 2002 b).

1.2 Variable Mikrosatellitensequenzen als epidemiologische Marker

Mikrosatelliten („short tandem repeats“, STR) sind kurze, repetitive Sequenzmotive von ein bis sechs Basenpaaren Länge, die ubiquitär in prokaryontischen und eukaryontischen Genomen selbst sehr primitiver Organismen verteilt sind (Field 1996). Sie weisen eine überdurchschnittlich hohe Mutationsrate im Bezug auf die Anzahl der Wiederholungen des repetitiven Elements und somit Längenpolymorphismen auf (Ellegren 2000 a). Während die Mutationsrate der eukaryotischen DNS-Sequenz mit ungefähr $1:10^9$ Bp pro Generation angegeben wird (Crow 1993), ist diese Rate bei Mikrosatelliten im Bereich von $1:10^3$ - 10^4 Bp pro Generation anzusiedeln (Weber 1993). Man geht davon aus, dass sich dieses Phänomen auf eine Dissoziation und versetzte Rehybridisierung der DNS-Polymerase an den Templatestrang innerhalb des Mikrosatellits zurückführen lässt. Dies hat zur Folge, dass sich ein ‚Frameshift‘-Intermediat bildet, das je nach Richtung des Fehlanlagerns der Polymerase entweder auf Primer- oder auf Templatesite einen extrahelikalen Anteil mit dem repetitiven Element aufweist (Abb. 2). Wird dieser bis zur nächsten Replikation nicht entweder durch die 3'-5' Exonukleaseaktivität der Polymerase, deren Effektivität mit zunehmender Repeatzahl kontinuierlich abnimmt (Kroutil 1996), oder durch das zelluläre ‚Mismatch repair‘-System (MMR) korrigiert, kommt es zu einer fixierten Veränderung in der Anzahl der Wiederholungen und somit der Länge des Mikrosatelliten (Gragg 2002).

Andere Hypothesen zu möglichen Mechanismen, die zu einer Änderung der Mikrosatellitenlänge führen könnten, haben sich bisher nicht bestätigen lassen. So ist es theoretisch möglich, dass Längenpolymorphismen durch interchromosomalen Austausch im Sinne von ungleichem ‚Crossing-over‘ verursacht sein könnten. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Mutationen an Mikrosatelliten zwischen hemizygoten Chromosomen und Chromosomenpaaren (Autosomen), was darauf

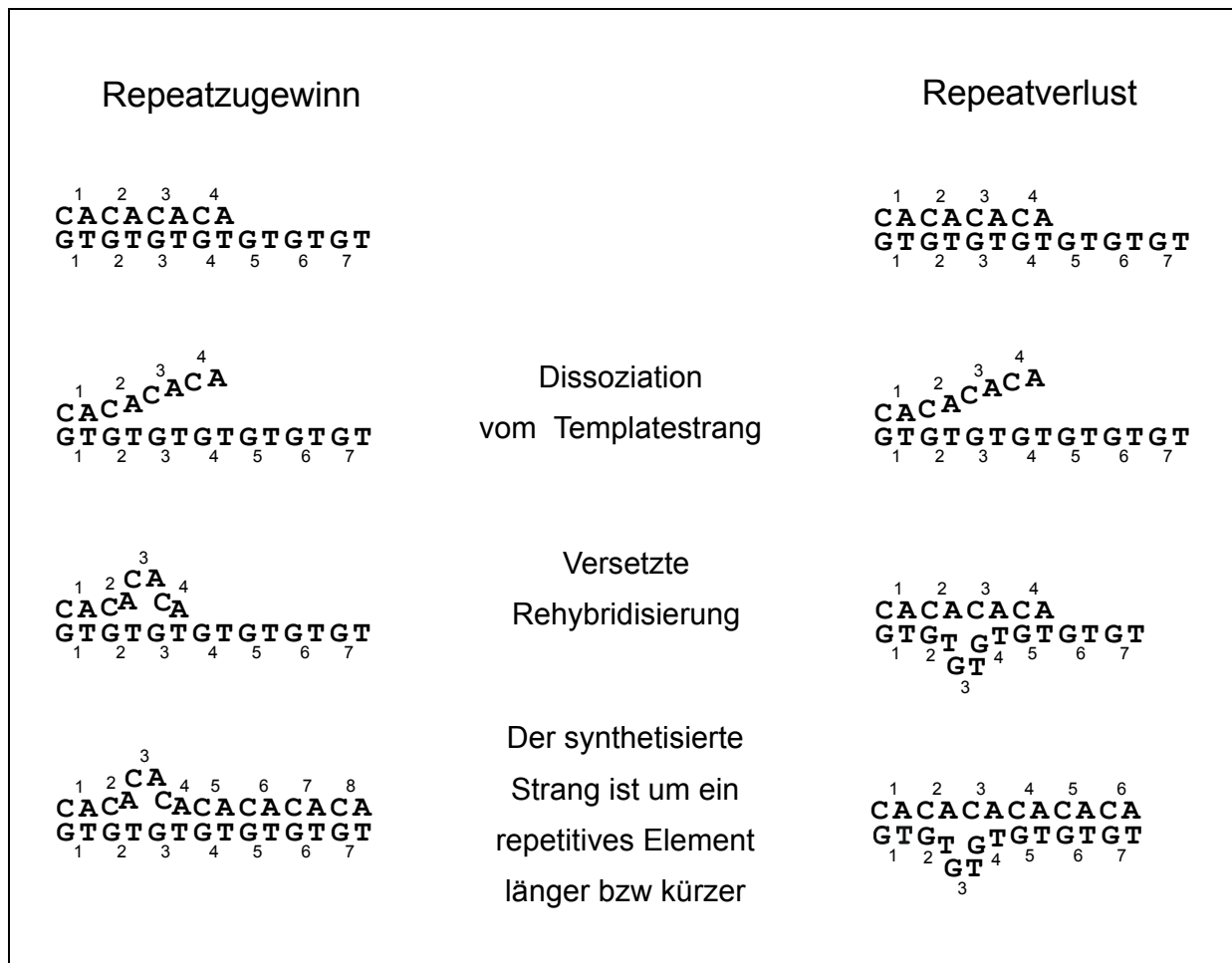


Abb. 2: angenommener Mutationsmechanismus bei Mikrosatelliten

schließen lässt, dass zu einer Veränderung in der Mikrosatellitenlänge kein Kontakt zwischen homologen Chromosomen notwendig ist (Heyer 1997).

Untersuchungen zu Mutationsraten bei Modifikationen im zellulären MMR-System (Gragg 2002) wie auch die Tatsache, dass beim Menschen Mutationen in diesem Enzymsystem eine Kanzerogenese durch Mikrosatelliteninstabilität begünstigen (Ho 2000, Lawes 2003), sprechen ebenfalls dagegen, dass der Mechanismus des interchromosomalen Austausches bei Mutationen an Mikrosatelliten eine wichtige Rolle spielt.

Da sich die flankierenden Regionen von Mikrosatelliten in ihrer Sequenz als stabil erwiesen haben, eignen sich Primerpaare, die eine repetitive Sequenz umspannen, ausgezeichnet für taxonomische und populargenetische PCR-Marker. Eine Sequenzierung der amplifizierten Fragmente ist nicht erforderlich, da sich die Allele vor allem

durch Längenpolymorphismen unterscheiden, also allein durch Gelelektrophorese oder Fragmentanalyse differenziert werden können.

Entscheidender Nachteil der Einteilung von Leishmaniaspezies in Mikrodeme ist der enorme Aufwand, den das Design von Primerpaaren mit sich bringt. Es hat sich gezeigt, dass Marker, die für eine Spezies entwickelt wurden, nicht ohne weiteres auf eine andere übertragbar sind (Jamjoom 2002 a). Entweder wird dann kein PCR-Produkt erhalten, oder die amplifizierten Mikrosatelliten sind monomorph und viel kürzer als die der Ursprungsspezies und eignen sich somit nicht für taxonomische Untersuchungen.

So wurden an Hand des sequenzierten *L. major*-Genoms 13 für *L. major* polymorphe Mikrosatellitenmarker entwickelt, von denen aber nur zwei auch für *L. donovani* polymorph waren (Jamjoom 2002 a). Für *L. donovani* und *L. infantum* sind zwei polymorphe Marker beschrieben (Rossi 1994), für *Viannia*-Spezies drei (Russel 1999). Primerpaare für drei weitere unabhängige Regionen mit insgesamt fünf Mikrosatelliten wurden basierend auf publizierte *L. major*-Sequenzen beziehungsweise der ITS-Region für *L. infantum* entwickelt (Bulle 2002). Allerdings sind mit solch kleinen Markersätzen wegen dem Phänomen der Homoplasie nur sehr eingeschränkt taxonomische oder populationsgenetische Studien innerhalb einer Spezies möglich (Winter 1998); wünschenswert wären hierzu zehn bis 20 unabhängige Primerpaare je Spezies (Ruzzante 1998).

Dementsprechend wurden kürzlich 20 polymorphe Marker für *L. donovani* entwickelt (Jamjoom 2002 b). Für *L. infantum* liegen im Moment nicht ausreichend polymorphe Marker vor; das Potential der Mikrosatellitenanalyse wurde aber auch für diese Spezies gezeigt (Bulle 2002).

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Leishmania infantum/chagasi gilt als eine ausgesprochen uniforme Leishmanienart, im Gegensatz zu *L. major* oder besonders *L. tropica*, die sich sowohl mit phänotypischen als auch mit genotypischen Methoden als weit heterogener darstellen. Bei *L. infantum* wurden zwar auch unterschiedliche Enzymmuster bestimmt, die auch zum Teil mit der Klinik der Erkrankung korrelieren, weltweit dominieren jedoch Stämme des Zymodems MON-1 in allen endemischen Gebieten vom östlichen Mittelmeerraum bis nach Süd-

amerika (Minodier 1997). Diese MON-1 Stämme verursachen sowohl kutane als auch viszerale Leishmaniose (Guerbouj 2001) und sind auch bei HIV-Koinfektionen beteiligt. Atypische Verläufe bei Patienten mit HIV/Leishmaniose-Koinfektion wie auch das Auftreten von nicht endemischen Stämmen in diesem Patientengut nehmen speziell im südlichen Europa zu (Pratlong 1995). Bei Hunden, die als Reservoir für *L. infantum* bekannt sind und eine wichtige Rolle bei der Übertragung dieser Parasiten spielen, wurden bisher fast ausschließlich Stämme des Zymodems MON-1 isoliert (Pratlong 1995). Wie die Transmission der nicht-MON-1 Stämme erfolgt und welche Reservoirwirte daran beteiligt sind, ist bisher noch völlig offen. Bei drogenabhängigen HIV-Patienten wird auch eine anthroponotische Übertragung diskutiert (Alvar 1994). Ob Leishmanioseerkrankungen bei Immunsupprimierten auf die Reaktivierung einer latenten Infektion oder aber auf eine Neuinfektion zurückzuführen sind, ist bisher unbekannt. So wurde auch bei gesunden Blutspendern Leishmanien im Blut nachgewiesen (le Fichoux 1999). Für die Klärung dieser und anderer epidemiologischer Fragen sind besser diskriminierende und einfacher durchzuführende Methoden dringend notwendig. Die Isoenzymanalyse ist zu zeit- und arbeitsintensiv und bietet nur eine unzureichende Stammdifferenzierung. Verschiedene molekulare Techniken, wie PCR-Fingerprinting (Kokozidou 2002) oder PCR-SSCP von anonymen Markern (El Fari, persönliche Mitteilung), konnten Stämme von *L. infantum* ebenfalls nicht ausreichend diskriminieren. Bulle et al. (2002) konnten jedoch zeigen, dass eine hohe Auflösung unterschiedlicher *L. infantum*-Stämme mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitensequenzen erreicht werden kann. Allerdings war die Anzahl von Sequenzen, die von diesen Autoren untersucht wurde, sehr gering und auch nicht alle dieser Marker waren unabhängig voneinander. Da bei Mikrosatellitenmarkern auf Grund ihrer speziellen Evolution die Gefahr von Homoplasie besonders groß ist, sind statistisch gesicherte Werte erst bei Verwendung von 10 - 20 voneinander unabhängiger, nicht gekoppelter Marker zu erwarten (Ruzzante 1998). Ziel dieser Arbeit war es, für *Leishmania d. infantum* einen für epidemiologische und populationsgenetische Untersuchungen ausreichend großen Satz von Mikrosatellitenmarkern zu entwickeln. Aus der Literatur (Jamjoom 2002 a) und Vorarbeiten der Forschungsgruppe (Schönian, persönliche Mitteilung) war bekannt, dass dafür die im *Leishmania major*-Genomprojekt publizierten Sequenzen nur im Ausnahmefall nutzbar waren. Mikrosatellitensequenzen, die bei *L. major* polymorph waren, ließen sich bei Stämmen von *L. infantum* entweder gar nicht amplifizieren oder waren monomorph und

wesentlich kürzer. Aus diesem Grund sollte für die Identifizierung variabler Mikrosatelliten bei *L. infantum* zunächst eine angereicherte genetische Bibliothek erstellt werden. Ein publiziertes Protokoll (Bloor 2001) sollte für einen Stamm des Zymodems MON-1 aus dem mediterranen Becken adaptiert werden. Mikrosatellitenenthaltende Klone sollten sequenziert und anhand der angrenzenden Sequenzen spezifische Primerpaare entwickelt werden. Unterschiede in der Anzahl der Mikrosatelliten sollten dann in der Polyacrylamidgelelektrophorese anhand ausgewählter Zymodeme des *L. donovani*-Komplexes, insbesondere von *L. infantum*, nachgewiesen werden. Ein besonderes Ziel war es dabei, Marker zu entwickeln, die Stämme innerhalb des Zymodems MON-1 unterscheiden können. Weiterhin sollte das Protokoll für angereicherte Mikrosatellitenbibliotheken so standardisiert werden, dass es leicht auf andere Parasiten- und Wirtsarten übertragen werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation der DNS

Zur Präparation der parasitären DNS wurden die frischen Zellen aus der Kultur bei 3000 rpm für 30 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Lysispuffer (50 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 7,4) aufgenommen. Nach Zugabe von 25 µl 20% SDS (Natriumdodecylsulfat) wurde leicht geschüttelt, bis die Lösung viskös wurde. Dann wurden 10 µl RNase (10 mg/ml, Sigma) zugegeben und bei 60°C 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 5,5 µl Proteinase K (20 mg/µl, Merk) wurde erneut bei 60°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde 1 ml gepuffertes Phenol (Roth) zugesetzt, 5 min geschwenkt und 10 min bei 13 200 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Zu dieser wurden 500 µl Phenol und 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (Roth) gegeben, erneut 5 min geschwenkt, 10 min zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Diese Schritte wiederholten sich nochmals nach Zugabe von 1 ml Chloroform (Roth), wobei beim Abpipettieren der wässrigen Phase deren Volumen bestimmt wurde.

Es wurden 0,1 Vol 3 M Na Acetat und 1 Vol Isopropanol zugegeben und zur Fällung der DNS bei 4°C für 1 h inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 13 200 rpm wurde die Flüssigkeit abgegossen und das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Darauf wurde erneut 15 min zentrifugiert, der Alkohol entfernt und das DNS-Pellet im Speed Vac für 8 min bei 30°C getrocknet. Abschließend wurde mit 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) resuspendiert. Die so erhaltene DNS wurde bei 4°C gelagert. Die Konzentration sowie die Reinheit der DNS wurden mit Hilfe eines Spektrophotometers bei $\lambda_1=260$ und $\lambda_2=280$ bestimmt. Dabei wurden 5 µl der Probe mit 95 µl BDH verdünnt.

2.2 Erstellen einer mit Mikrosatelliten angereicherten Genbibliothek

Die Konstruktion der Bibliothek basierte auf einem Protokoll von Bloor et al. (2001). Die DNS des ausgewählten Leishmanienstammes (MHOM/ES/93/PM1, MON-1) wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A1 verdaut und ein Adaptor, bestehend aus zwei Oligonukleotiden Oligo A (21 Bp) und Oligo B (25 Bp), an die beiden Enden der dabei entstandenen Fragmente ligiert. Der gesamte Ansatz wurde neben einer 1kB-Leiter auf ein Agarosegel aufgetragen. Der Bereich zwischen 400 und 1000 Bp wurde ausgeschnitten und aufgereinigt. Eine Anreicherungsprozedur mit biotinylierten Oligonukleotiden, gebunden an M-280 Dynabeads, wurde durchgeführt, und die so erhaltenen Fragmente durch anschließende PCR mit Oligo A als Primer amplifiziert. Nach Aufreinigung wurden die Produkte in einen Vektor ligiert und anschließend in kompetente Zellen transformiert. Die Zellsuspension wurde auf mit X-gal, IPTG und Ampicillin präparierte LB-Agar-Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die positiven Klone wurden auf Ampicillin enthaltenden LB-Platten überführt.

2.2.1 Präparation des Adaptors

Ein Gemisch von je 10 µl von 200 µM Lösung der Oligonukleotide Oligo A (5' GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG 3') und Oligo B (5' PO₄ - GAT CCG AAG CTT GGG GTC TCT GGC C 3'), dessen 5'-Ende der spezifischen Sau3A1-Restriktionsschnittstelle entspricht (Abb. 3), (Refseth 1997) wurde bei 80°C für 5 min denaturiert und anschließend 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden mit 60 µl BDH aufgefüllt (entspricht einer Endkonzentration von 25 pmol/µl), Aliquots hergestellt und diese bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.2 Verdau und Adaptorligation

In einem Digestionsansatz von 90 µl wurden 9 µl 10 x Restriktionsenzym-Puffer (New England BioLabs), 4 µl DNS (2368 ng/µl, entspricht 9,472 µg), 0,9 µl bovines Serum-

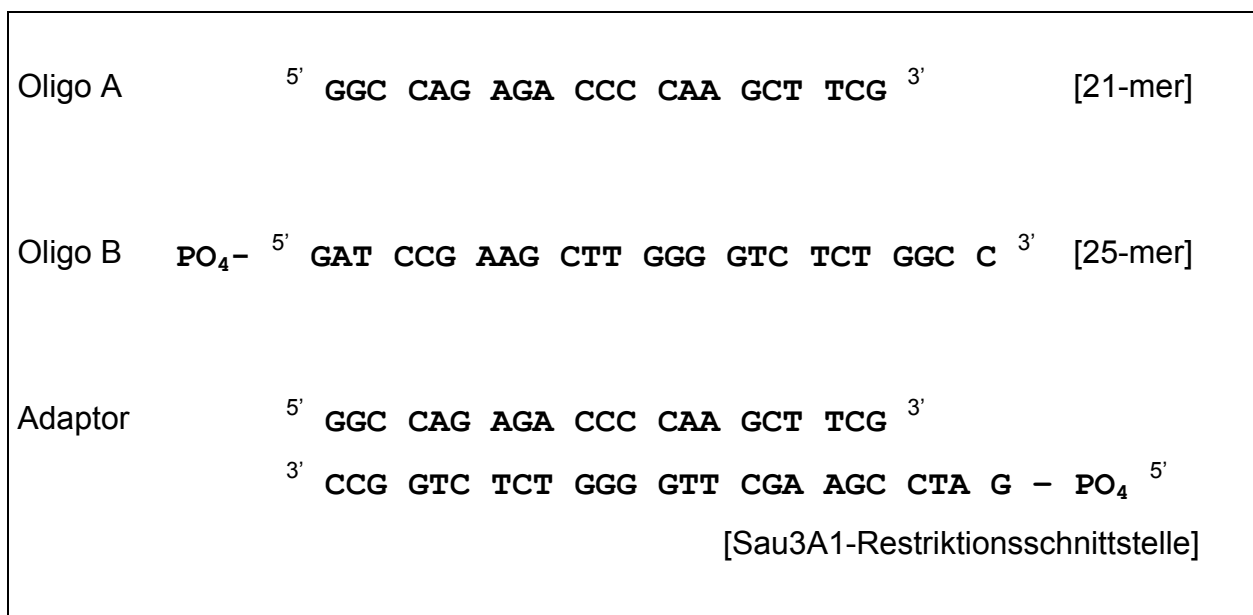


Abb. 3: Sau3A1-spezifischer Adaptor und seine Bestandteile

albumin x 100 (New England BioLabs) und 10 µl Sau3A1 (4000 U/ml, New England BioLabs) 2 h bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde danach durch Erwärmung auf 65°C für 10 min inaktiviert.

Für die Ligation des Adaptors an die so entstandenen Fragmente wurden 20 µl 10 x Ligasepuffer, 10 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl, New England BioLabs) und 50 pmol Adaptor beigelegt und mit BDH auf 200 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, die Ligase danach durch Erwärmung auf 65°C für 10 min inaktiviert.

2.2.3 Größenselektion der Fragmente und Probe-PCR

Der 200 µl Ligationsansatz wurden zusammen mit 40 µl Ladepuffer x 6 (50% Glycerin, 0,1 g/100 ml Bromphenolblau, 0,1 M EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 8) neben 10 µl einer 1kb-Leiter (Invitrogen) auf ein Agarosegel (1,5 g/100 ml 1 x TBE-Puffer (Sambrook 1989)) aufgetragen. Nach ca 1 h bei 80 V wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt. Die Größenfraktion zwischen 400 und 1000 Bp wurde unter UV-Transillumination bei λ=312 nm mit einem Skalpell aus der Agarose exzidiert, in Stücke zu maximal 400 µg aufgeteilt und in vorher abgewogene Eppendorfgefäße

überführt. Zur Aufreinigung der DNS-Fragmente wurde der QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen) gemäß dem beiliegenden Standardprotokoll verwendet. Eluiert wurde mit 30 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5). Die so erhaltenen Eluate (5 x ca 28 µl) wurden zusammen auf eine Microcon YM-50 spin column (Millipore) aufgetragen, bei 13 000 rpm für 4 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die DNS von der umgedrehten spin column durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 1 min in ein neues Eppendorfgefäß überführt, was etwa 13 µl DNS-Konzentrat ergab.

Die erfolgreiche Ligation an den Adaptor sowie die Größenselektion wurden mit einer Test-PCR überprüft: Ein mit Mineralöl (Sigma) überschichteter Reaktionsansatz von 25 µl mit 2,5 µl 10 x Puffer (Roche), 200 µM je dNTP (Amersham Biosciences), 2 mM $MgCl_2$, 25 pmol Oligo A, 0,2 µl Taq-polymerase (Amplitaq, 5 U/µl, Roche) und 0,5 µl konzentrierten DNS-Fragmenten wurde nach 10 min Denaturierung bei 95°C in 35 Zyklen von je 95°C für 30 s, $T_A=56^\circ C$ für 30 s und 72°C für 1 min amplifiziert. Nach einer terminalen Elongation bei 72°C für 6 min wurde das Amplifikat auf 4°C heruntergekühlt. 10 µl PCR-Produkt wurden dann neben einer 1kb-Leiter (10 µl) auf ein Agarosegel (1,2 g/100 ml 1 x TBE-Puffer) aufgetragen (Abb. 4).

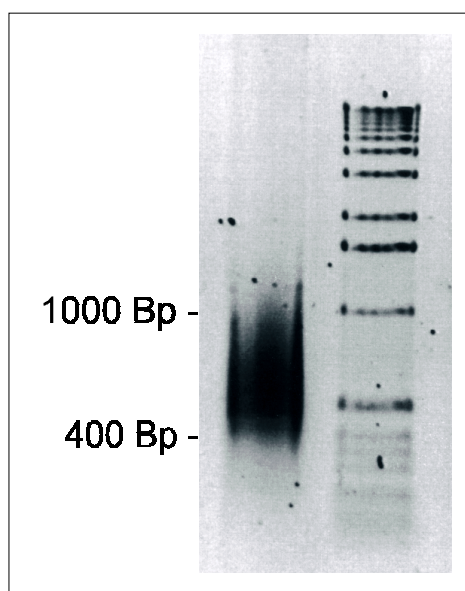


Abb. 4: Ein Schmier im Bereich von 400 bis 1000 Bp spricht für erfolgreiche Adaptor-ligation und Größenselektion.

2.2.4 Anreicherung von Mikrosatelliten enthaltenden Fragmenten

In einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurden 100 µl mit Streptavidin beschichtete M-280 Dynabeads (10 mg/ml, Dynal) zweimal in 100 µl 1 x Washing/Binding(W/B)-Puffer (1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gewaschen. Waschen soll im Weiteren bedeuten, dass das Reaktionsgefäß in einem magnetischen Ständer platziert wird, so dass die Beads sich an der dem Magneten zugewandten Seite des Gefäßes ansammeln. Daraufhin wird, ohne mit der Pipettenspitze die Beads zu berühren, der gesamte Überstand abgenommen. Das Gefäß wird vom Magneten entfernt und anschließend die Dynabeads mit dem jeweiligen Puffer resuspendiert.

Nach dem zweiten Waschschrift wurde in 200 µl 2 x W/B-Puffer (2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert, 2 µl 3'-biotinyliertes Oligonukleotid (GT)₁₀ (100 pmol/µl) zugegeben und mit BDH auf 400 µl aufgefüllt (*Ansatz 1*). Das Reaktionsgefäß wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei alle 10 min leicht geschüttelt wurde.

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden währenddessen 15 µl 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat), 10 µl konzentrierte DNS-Fragmente und 20 pmol Oligo A in einem Ansatz von 50 µl vorbereitet (*Ansatz 2*).

Daraufhin wurde *Ansatz 1* einmal mit 400 µl 1 x W/B-Puffer und zweimal mit 400 µl 6 x SSC gewaschen und mit 50 µl 6 x SSC resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und bei $T_{hyb}=55^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Im Thermocycler wurde folgendes Programm für *Ansatz 2* eingegeben: 95°C für 10 min, $T_{hyb}=55^{\circ}\text{C}$ für 30 min und 70°C für 2 h. Sobald das Thermocyclerprogramm auf die Hybridisierungstemperatur T_{hyb} herunterkühlte, wurde der ebenfalls auf dieser Temperatur gehaltene *Ansatz 1* aufgeschüttelt und vollständig dazugegeben, um ein Anlagern der einzelsträngigen DNS an die vorher an die Avidin-Beads gebundenen biontinylierten (GT)₁₀-Oligonukleotide zu ermöglichen. Während des weiteren Programms wurde regelmäßig das Gefäß leicht geschüttelt, um ein Absetzen der Dynabeads zu verhindern. Nach 2 h Inkubation bei 70°C wurden die Dynabeads mit dem Magneten separiert, zugänglich vom Überstand befreit, in 100 µl 2 x SSC resuspendiert und das Gemisch in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Es folgten 4 Waschschriffe mit 2 x SSC und 4 Waschschriffe mit 1 x SSC. Hierbei wurde jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der Magnet angelegt und der Überstand abgenommen wurde.

Nach Resuspension in 100 μl 1 x SSC wurde der Ansatz in vier Aliquots zu je 25 μl aufgeteilt und zu jedem 250 μl 1 x SSC hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei Hybridisierungstemperatur $T_{\text{hyb}}=55^{\circ}\text{C}$ wurden die Beads mit dem Magneten separiert, rasch vom Überstand befreit und 30 s mit 400 μl 1 x TE sowie 30 s mit 400 μl 50 mM NaCl gespült. Nach abschließender Resuspension mit BDH sollte die Beadkonzentration 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ betragen. Diese Suspension diente in der darauf folgenden PCR als Template. In zwei Experimenten wurde ein zusätzlicher Arbeitsschritt durchgeführt, in dem die so angereicherte DNS nach der Hitzedenaturierung eluiert und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR-Reinigungskits (Qiagen) nochmals aufgereinigt wurde, um zu verhindern, dass bei der anschließenden PCR die $(\text{GT})_{10}$ -Oligonukleotide störend einwirken könnten. Dabei wurde die Beadsuspension 5 min bei 90°C inkubiert und zügig vom Überstand befreit. Dieser Vorgang wurde nach Resuspension mit 50 μl BDH wiederholt (Refseth 1997). Die insgesamt 100 μl DNS-Suspension wurden mittels PCR-Reinigungskit von Oligonukleotidresten befreit (eluiert wurde mit 50 μl BDH). In diesem Falle dienten 10 μl dieses Eluats als Template für die nachfolgende PCR.

2.2.5 PCR, Testelektrophorese und Ligation in p-Drive-Vector

Für die Amplifikation der angereicherten Fragmente wurde ein Reaktionsansatz von 50 μl mit 5 μl 10 x Puffer, 200 μM je dNTP, 2 mM MgCl_2 , 30 pmol Oligo A, 0,2 μl Taq-polymerase und 8 μl Beadsuspension nach 10 min Denaturierung bei 95°C in 35 Zyklen von je 95°C für 30 s, $T_A=56^{\circ}\text{C}$ für 30 s und 72°C für 1 min amplifiziert. Nach einer terminalen Elongation bei 72°C für 30 min wurde das Amplifikat auf 4°C heruntergekühlt. 10 μl des PCR-Produkts wurden zur Kontrolle neben einer 1 kb-Leiter (10 μl) aufgetragen. Das übrige PCR-Produkt wurde mit einem MinElute PCR-Reinigungskit (Qiagen) aufgereinigt (Elution mit 10 μl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Zur Ligation wurden 1 μl p-Drive-Vector (Qiagen), 4 μl eluierte PCR-Produkte und 5 μl 2 x Ligationsmastermix (Qiagen) 2 h bei 4°C inkubiert und danach bei -20°C gelagert.

Es ist unbedingt notwendig, die Ligation in den Vektor möglichst bald nach der PCR durchzuführen, da der Vektor einen U-Überhang aufweist, der zur suffizienten Ligation einen A-Überhang von Seiten des Amplifikates voraussetzt. Dieser wird von der Taq-Polymerase erzeugt, ist aber instabil.

2.2.6 Präparation der Agarplatten

Es wurden ampicillinhaltige LB-Agarplatten sowohl mit als auch ohne X-gal und IPTG hergestellt. Für 1 l (ca 40 Platten) wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast und 10 g NaCl eingewogen und mit BDH auf 1 l aufgefüllt. Nach Zusatz von 15 g Bacto-Agar wurde autoklaviert, das Gemisch auf 50°C abgekühlt und 100 mg Ampicillin (Roth) sowie eventuell 80 mg X-Gal (80 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosidase gelöst in 1600 μ l N,N'-dimethyl-Formamid) und 0,5 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, Roth) zugegeben. Nach dem Gießen wurden die Platten mindestens 30 min bei Raumtemperatur zur Aushärtung stehen gelassen und danach bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Für LB-Medium wurden lediglich Bacto-Trypton (10 g), Bacto-Yeast (5 g) und NaCl (10 g) mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

2.2.7 Transformation in kompetente *E. coli*-Bakterien

50 μ l kompetente Zellen (EZ-Competent Cells, Qiagen) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l des Ligationsansatzes versetzt. Das Gefäß wurde 5 min auf Eis, 30 s bei 42°C und danach erneut 2 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium (Qiagen) bei Raumtemperatur wurden je 50 μ l der Zellsuspension zusammen mit 50 μ l LB-Medium auf mit Ampicillin, X-Gal und IPTG präparierten Platten ausgestrichen. Diese wurden 18 h bei 37°C inkubiert.

Positive (weiße) Kolonien wurden mit sterilen 200 μ l-Pipettenspitzen oder autoklavierten Zahnstochern auf ampicillinhaltige Platten überführt, ebenfalls 18 h bei 37°C inkubiert und mit Nummern versehen. Danach wurden die Platten bei 4°C gelagert.

2.3 Screening der Kolonien nach (GT)₁₀-positiven Klonen und Aufbereitung zur Sequenzierung

Zur Identifizierung (GT)₁₀-positiver Klone wurde in einem Reaktionsansatz von 25 µl eine Kolonie-PCR durchgeführt, wobei intakte *E. coli*-Bakterien aus den positiven Kolonien mit Zahnstochern oder Pipettenspitzen von der Platte in die Reaktionsgefäße überführt wurden. Zusätzlich zu den Standardprimern M13R (5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3') und M13F (5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3') wurde ein Oligonukleotid mit repetitiver Sequenz (5' ACA CAC ACA CAC ACA CAC AC 3') als Primer zugegeben (Jamjoom 2002 b). Der 25 µl-Ansatz mit 2,5 µl 10 x Puffer, 200 µM je dNTP, je 5 pmol M13F, M13R und (AC)₁₀, 0,1 µl Taq-Polymerase und Template wurde nach 10 min Denaturierung bei 95°C in 35 Zyklen von je 95°C für 30 s, T_A=52°C für 30 s und 72°C für 1 min amplifiziert. Nach einer terminalen Elongation bei 72°C für 10 min wurde das Amplifikat auf 4°C heruntergekühlt und eine Elektrophorese wie bereits beschrieben durchgeführt.

Die durch Doppelbande als positiv identifizierten Klone wurden auf den Ampicillin-Platten erneut aufgesucht und die klonierte Sequenz mit folgender Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer SEQ_fw24 (5' ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG 3') und SEQ_rev23 (5' TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') amplifiziert: In einem 50 µl-Ansatz mit 5 µl 10 x Puffer, 200 µM je dNTP, je 10 pmol SEQ_fw24 und SEQ_rev23, 0,2 µl Taq-Polymerase und Template wurde nach 10 min Denaturierung bei 95°C in 35 Zyklen von je 95°C für 30 s, T_A=55°C für 30 s und 72°C für 1 min amplifiziert. Nach einer terminalen Elongation bei 72°C für 10 min wurde der Ansatz auf 4°C heruntergekühlt.

Die PCR-Produkte wurden mit einem QIAquick PCR-Reinigungskit (Qiagen) aufgereinigt (Elution mit 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5). Je 5 µl wurden zur Konzentrationsbestimmung auf einem Agarosegel (1,2 g/100 ml 1 x TBE-Puffer) neben 10 µl SmartLeiter (Eurogentec) aufgetragen und für die Sequenzierung verdünnt. Kolonien, die bei dieser PCR in der Elektrophorese Doppelbanden zeigten, wurden unter der Annahme aussortiert, dass es sich um eine Mischkolonie aus zwei oder mehr Klonen handelte. Die Sequenzierung erfolgte kommerziell.

2.4 Design von Primern für die Amplifizierung spezifischer Mikrosatellitenmarker

Für Klone, die Mikrosatelliten enthielten, wurde, sofern die flankierenden Sequenzen ausreichende Länge aufwiesen, mittels der Primer3-Software (Rozen 1998) Primer für Fragmente mit einer Gesamtlänge von ca 100 Bp entwickelt.

Bei den Sequenzen ohne ausreichend flankierende Regionen wurde eine BLAST (‚Basic local alignment search tool’)-Suche gegen die Datenbank des ‚National Center for Biotechnology Information’ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) durchgeführt. Bei Suchtreffern in den Genomen anderer Leishmaniaspezies mit repetitiver Sequenz an gleicher Position wurde eine Hybridsequenz aus klonierter auf der einen und gefundener Sequenz auf der anderen Seite des Mikrosatellits gebildet und diese zum Primerdesign genutzt.

2.5 Optimierung der PCR-Bedingungen für die ermittelten Primerpaare

Mit einem Temperaturgradienten von $T_A=44 - 58^{\circ}\text{C}$ wurde für jedes Primerpaar die optimale Annealingtemperatur T_A mit einem standardisierten Mikrosatelliten-PCR-Programm bestimmt. Dieses beinhaltete einen 50 μl -Ansatz mit 5 μl 10 x Puffer, 200 μM je dNTP, 10 pmol je Primer, 40 ng *Leishmanien*-DNS und Taq-Polymerase und ein Programm mit anfänglicher Denaturierung von 95°C für 5 min, 35 Zyklen mit 95°C für 30 s, T_A für 30 s und Elongation bei 72°C für 1 min sowie einer terminalen Elongationszeit von 10 min bei 72°C gefolgt von Kühlung bei 4°C . Es wurde DNS des klonierten Stammes MHOM/ES/93/PM1 als Template eingesetzt.

Nach Bestimmung von T_A wurde für jedes Primerpaar unter den selben Bedingungen die PCR mit DNS-Proben der in Tab. 1 aufgeführten Stämmen durchgeführt. 5 μl der PCR-Produkte wurde zur Kontrolle neben einer 1 kb-Leiter aufgetragen. Die Primerpaare, die bei diesen Stämmen nicht immer zu einem Amplifikat führten, wurden nicht weiter ausgetestet.

	WHO-Code	Zymodem	Herkunft	Spezies*
1	MHOM/TN/80/IPT1	MON-1	Tunesien	<i>L. infantum</i>
2	MHOM/ES/93/PM1	MON-1	Spanien	<i>L. infantum</i>
3	MHOM/FR/95/LPN114	MON-1	Frankreich	<i>L. infantum</i>
4	MCAN/FR/87/RM1	MON-108	Frankreich	<i>L. infantum</i>
5	MHOM/ES/88/LEM175	MON-198	Spanien	<i>L. infantum</i>
6	MHOM/ES/92/LEM373	MON-199	Spanien	<i>L. infantum</i>
7	MCAN/ES/86/LEM935	MON-77	Spanien	<i>L. infantum</i>
8	MHOM/CN/78/D2	LON-49	China	<i>L. infantum</i>
9	MHOM/SD/97/LEM3472	MON-267	Sudan	<i>L. infantum</i>
10	MHOM/ET/72/GEBRE1	MON-82	Äthiopien	<i>L. archibaldi</i>
11	MHOM/SD/97/LEM3463	MON-258	Sudan	<i>L. archibaldi</i>
12	MHOM/IN/80/DD8	MON-2	Indien	<i>L. donovani</i>
13	MHOM/KE/83/NLB189	-	Kenia	<i>L. donovani</i>

Tab. 1: Stämme des *L. donovani*-Komplexes, die in dieser Arbeit verwendet wurden

(* Speziesbezeichnungen nach MLEE (Pratlong 2001))

Mit den Sequenzen aller verwendeten Mikrosatellitenmarker wurde eine BLAST-Suche gegen die Datenbank des ‚National Center for Biotechnology Information‘ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) durchgeführt, um die Lokalisation der amplifizierten Mikrosatelliten innerhalb des Leishmaniengenoms an Hand bereits analysierter Daten anderer Leishmanienspezies festzustellen.

2.6 Testung der Mikrosatellitenmarker auf Längenpolymorphismen

Für die Fragmentlängenanalyse mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurden die PCR-Produkte vom Mineralöl befreit und mittels Speed Vac auf ein Volumen von etwa 20 µl aufkonzentriert. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels (12%) von 0,8 mm Dicke wurden beide Platten mit BDH und Alkohol (96%) gereinigt und die Ohrenplatte mit Acrylease (Stratagene) behandelt. Für 150 ml Gel wurden 45 ml gasstabilisiertes Acrylamid Bis-Acrylamid 29:1, 40% (Rothphorese Gel 29, Roth), 15 ml

10 x TBE und 90 ml BDH gemischt. Die Polymerisierung wurde durch die Zugabe von 750 µl APS 10% (Amoniumperoxodisulfat, Merk) und 75 µl Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Serva) gestartet. Die Gelplatten wurde in ein vertikales Elektrophoresesystem eingespannt, obere und untere Pufferkammer mit 0,5 x TBE gefüllt und ein Vorlauf bei 10 W für 30 min gestartet. Dann wurden je 8 µl der konzentrierten PCR-Produkten zusammen mit 2 µl Ladepuffer neben 8 µl 10 Bp-Leiter (das entspricht 5,2 µl TE-Puffer pH 8, 1,6 µl Ladepuffer, 1,2 µl 10 Bp-Leiter Stocksolution Standard, Invitrogen) aufgetragen.

Nach 18 h Elektrophorese bei 10 W wurde das Polyacrylamidgel 10 min in Salpetersäure (1%) fixiert und 25 min in Silbernitratlösung (0,2%) gefärbt. Die Gele wurden in 0,28 M Natriumcarbonatlösung, der unmittelbar vor Gebrauch 500 µl mit Methanol stabilisiertes Formalin 37% (500 µl/l, Merk) zugesetzt wurde, entwickelt und in 10% Essigsäure fixiert. Die Gele wurden auf Filterpapier gelegt, im Geltrockner bei 80°C 2 h getrocknet und anschließend eingescant. Die Größe der amplifizierten Mikrosatellitenfragmente wurde mit Hilfe der Bionumerics-Software V 2.5 (Applied Maths BVBA) ermittelt.

Anstelle der aufwendigen PAGE-Analyse in zukünftigen Studien mit Mikrosatellitenmarkern wurde die halbquantitative Analyse der Fragmentlänge mittels Gelelektrophorese in MetaPhor-Agarosegelen (4 g/100 ml TBE, BioWittaker Molecular Applications) für einige Marker erprobt. Hierbei wurde die Agarose langsam in zuvor auf 4°C gekühlten TBE-Puffer unter Rühren zugegeben und 15 min zum Quellen auf 4°C gestellt. Anschließend wurde die Agaroselösung 1 min in der Mikrowelle bei mittlerer Energie erwärmt, erneut 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich gekocht. Um den Wasserverlust, der durch das lange Kochen bis zur vollständigen Homogenisierung entsteht, exakt ausgleichen zu können, wurde das Gefäß vor und nach dem Erhitzen gewogen. Nach dem Gießen wurde 30 min bei 4°C ausgehärtet.

Es wurden die gleichen Mengen PCR-Produkt und 10 kb-Leiter wie bei der Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetragen und mit 6 V/cm Elektrodenabstand in der Elektrophoresekammer für 3,5 h getrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, die Mikrosatellitenfragmente mittels Eagle Eye-System visualisiert und mit der Bionumerics-Software ausgewertet.

2.7 Geräte und Dienstleistungen

Folgende Geräte wurden verwendet:

Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Concentrator 5301	Eppendorf
Ultrospec III	Pharmacia
Transilluminator TFX	Vilber/Lourmat
Eagle Eye II	Stratagene
RoboCycler Gradient 40	Stratagene
Gene Amp PCR System 9600	Perkin/Elmer
Thermocycler 60	Bio-med
Geltrockner Maxidry D 64	Biometra

Die Synthese sowie die Modifikation von Oligonukleotiden geschah durch die Firma Tib Molbiol, Berlin. Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma Meixner DLMBC, Berlin ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung einer CA/GT-Mikrosatelliten-Bibliothek

Mikrosatelliten seien im weiteren definiert als Dinukleotidrepeats von mindestens 16 Bp Länge, Trinukleotidrepeats von mindestens 12 Bp Länge und aus nicht mehr als zwei verschiedenen Elementen zusammengesetzte (,imperfekte') Mikrosatelliten (Weber 1993) von insgesamt 30 Bp Länge. Im Falle der unten beschriebenen Artefaktbildung gilt als Mikrosatellit ein abgeschnittener Dinukleotidrepeat von mindestens 10 Bp Restlänge.

Es wurden vier Genbibliotheken erstellt, bei denen jeweils die Anreicherung mittels Dynabeads modifiziert wurde. So wurde im ersten Durchgang mit 5'-biotinylierten Oligonukleotiden hybridisiert. Bei der darauf folgenden PCR fungierten (GT)₁₀-Oligonukleotide mit freiem 3'-Ende als Primer, was eine Verkürzung der Mikrosatelliten enthaltenden Fragmente zur Folge hatte (Koblízková 1998). Bei den so erhaltenen 17 positiven Sequenzen lagen die gesuchten repetitiven Sequenzen immer an einem Ende der klonierten Sequenz, so dass die Entwicklung von Primerpaaren nicht möglich war.

Um diese Artefaktbildung zu vermeiden, wurde im zweiten Durchgang die angereicherte DNS, statt sie mit biotinylierten Oligonukleotiden und Dynabeads zusammen als Suspension dem PCR-Ansatz beizufügen (Abb. 5, PCR₁), zunächst von den an die Dynabeads gebundenen Oligonukleotiden durch Hitzedenaturierung eluiert. Das Eluat wurde danach mittels PCR-Aufreinigungs kit (Qiagen) von eventuellen Primerrückständen befreit. Dieses Vorgehen führte jedoch ebenfalls bei immerhin 22 von 26 auf Mikrosatelliten positiven Klonen zur oben beschriebenen Artefaktbildung.

Im dritten Durchgang wurde das Oligonukleotid am 5'-Ende biotinyliert und am 3'-Ende durch ein angehängtes Phosphat blockiert. Im vierten Durchgang wurde die Biotinylierung am 3'-Ende vorgenommen. In beiden Fällen wurde eine Artefaktbildung wie oben beschrieben vollständig verhindert. Durchgang 4 lieferte die Sequenzen für zehn der 15 in Tab. 3 aufgeführten Primerpaare.

Die Effizienz der Anreicherung ist stark von der Hybridisierungstemperatur T_{hyb} abhängig. In Durchgang 1 bis 3 wurde mit $T_{\text{hyb}}=60^{\circ}\text{C}$, in Durchgang 4 dagegen mit $T_{\text{hyb}}=55^{\circ}\text{C}$ hybridisiert. Im ersten Durchgang enthielten 9,8%, im zweiten Durchgang 14,4% und im dritten Durchgang 9,1% aller untersuchten Kolonien Mikrosatellitensequenzen im Sinne der oben aufgeführten Definition. Dagegen konnten im vierten Durchgang 49,5% positive Klone identifiziert werden (Tab. 2).

Durchgang	T_{hyb}	Kolonien			Redundanzen
		untersucht	sequenziert	positiv	
1	60°C	173	17	$17^{/17*}$	0
2	60°C	181	43	$26^{/22*}$	0
3	60°C	690	63	11	7
4	55°C	101	59	50	18

Tab. 2: Anteil an positiven Kolonien und Redundanzen (* davon Artefakte)

Weiterhin wurde versucht, eine PCR-Amplifikation vor der Anreicherung durchzuführen (Abb. 5, PCR_{2a}), die DNS nach Anreicherung von den Beads zu eluieren (2.2.4), das Eluat mittels spin column (Millipore) aufzukonzentrieren und dann ohne weitere Amplifikation (Abb. 5, gestrichelte Linie) in den Vektor zu ligieren. Dies führte in allen 84 untersuchten Kolonien zu einer direkten Ligation der beiden Vektorenden (Vektor- π -Vektor). Da vor der Ligation die Konzentration der DNS photometrisch gemessen und als ausreichend befunden wurde, muss davon ausgegangen werden, dass der instabile A-Überhang durch die Taq-Polymerase durch den Anreicherungsschritt beseitigt wurde. Es konnte aber gezeigt werden, dass durch die Amplifikation vor der Anreicherung (Abb. 5, PCR_{2a}) genug Material für diverse Anreicherungsschritte gewonnen werden kann. So kann nach einmaliger Digestion, Adaptorligation, Größenselektion und zusätzlicher PCR (Abb. 5, PCR_{2a}) mit mehreren Oligonukleotiden unterschiedlicher Mikrosatellitensequenzen angereichert werden. Nach einer weiteren Amplifikation (Abb. 5, PCR_{2b}) und Ligation in den Vektor erhält man ausreichend viele Fragmente unterschiedlicher Länge innerhalb des zu erwartenden Größenintervalls (400-1000 Bp plus Länge der beiden mitamplifizierten Vektorstücke).

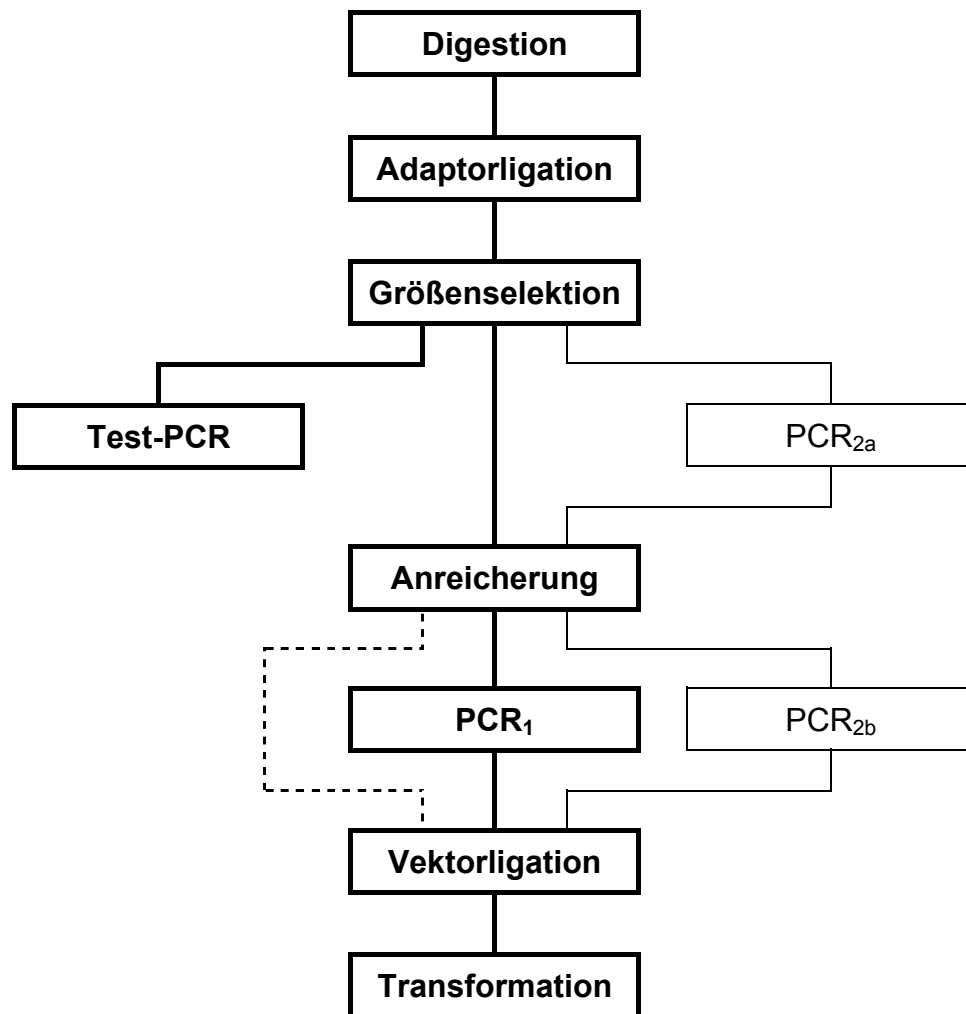


Abb. 5: Fließschema: Anlegen der angereicherten genetischen Bibliothek

Beim Durchsuchen der Bibliothek auf Mikrosatellitensequenzen mittels Kolonie-PCR mit (AC)₁₀-Oligonukleotid (2.3) zeigte sich bei Mikrosatelliten enthaltenden Kolonien statt einer starken Bande zwei etwas schwächere Banden (Abb. 6). Dabei konnten bereits Aussagen über die Position und Länge der gefundenen repetitiven Sequenzen gemacht werden. Bei einer Doppelbande konnte durch die Längenbestimmung der zwei amplifizierten Fragmente mittels einer mitaufgetragenen 1 kB-Leiter die ungefähre Position des Mikrosatelliten innerhalb der klonierten Sequenz bestimmt werden.

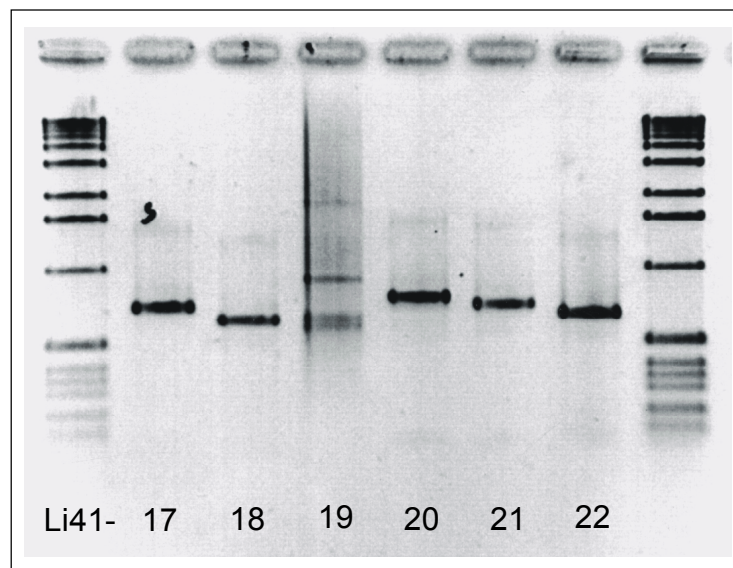


Abb. 6: die positive Kolonie (41-19) zeichnet sich durch deutliche Doppelbande aus

3.2 Sequenzauswertung und Primerdesign

Insgesamt enthielten 104 von 1154 untersuchten Klonen Mikrosatellitensequenzen. Redundanzen und unzureichende Flankenregionen reduzierten die Anzahl der verwendbaren Mikrosatelliten auf 28. Für sieben Klone mit abgeschnittenem Mikrosatelliten aus den ersten zwei Durchgängen fanden sich eindeutige Übereinstimmungen mit Sequenzen der Datenbank, sechs davon von *L. major* und eine von *L. donovani*. In drei Fällen fand sich an erwarteter Stelle ein der klonierten Sequenz gleichgearteter Mikrosatellit. Die Templatesequenzen von Li21-32F und Li21-34R stammen von *L. major* MHOM/IL/80/Friedlin (Datenbank-Nr.: AE001274), die von Li23-41F von *L. donovani* MHOM/ET/67/HU3(LV9) (Datenbank-Nr.: AF427881). Für die 28 vollständigen und die drei mit Sequenzen aus der Datenbank ergänzten Mikrosatellitenregionen wurden Primerpaare entwickelt. 22 dieser Primer lieferten für alle untersuchten Stämme ein Amplifikat der gewünschten Fragmentgröße. Die anschließende Analyse zeigte weitere Redundanzen auf, was die endgültige Zahl der Marker auf 15 reduzierte (Tab. 3). Auch mit diesen wurde eine BLAST-Suche durchgeführt, um ihre Lokalisationen im Gesamtgenom zu bestimmen (Tab. 3).

Primerpaar	Sequenz (5'-3')	T _A	Repeats PM1, alle Stämme	Anzahl Allele	Lokalisation
Li21-34	F: GAGAAAGCAAGACACGAGATGA R: GAGGCGTTTTCTTCTGGTAG	52	(AC) 9, 2-9	6	Chr. 1 (<i>L. major</i>)
Li22-35	F: CTTGATGTTTCGGGTTAGCAAGT R: ATGCACACCAAAAATCATGTG	52	(CA) 14, 8-28	11	
Li23-41	F: GATCGGAGGTGACAGCGT R: CCTTTAACTGCCAGTGCG	52	(GT) 16, 8-31	7	
Li45-24	F: GCGCCTACAGGCATAAAAGGA R: CTGGCGCATCAACGGTGT	54	(AC) 15, 9-20	9	
Li51-40	F: CGAACAACCCTGTATCACCC R: GCCGTTCTTCTTTTCGTTAGC	50	(GT) 9, 6-9	4	Minicircle-kDNS (<i>L. infantum</i>)
Li71-33	F: CTCCTTTTCACACCGCCTCT R: GAGAGAAGACGAGCCGAAGT	50	(TG) 11, 8-13	4	
Li71-5/2	F: GCACGGTCGGCATTGTGA R: GATAAACGAGATGGCCGC	50	(CA) 9, 7-9	3	Chr. 35 (<i>L. major</i>)
Li71-41	F: ATGCGCAAGAGAAGGAAAAG R: TGCCTCATTTTCGCTCATAGTC	50	(CTCTTYT*) 4, 3-4	2	
Li71-42	F: CCAAGCACCACTCAAGCATA R: TCTTGTCCTCTTCGGTGCTT	54	(AC) 9, 7-12	4	
Li72-14	F: AGAGTGTCTGCGCGTGAGTA R: AAGAAAAGAAGGTGCAGCGA	54	(TG) 10, 8-11	3	
Li72-20	F: GATCCCTTCGGATTACTGC R: CTGCTAGCGAGGGGATAGG	50	(CA) 12, 9-14	6	Chr. 35 (<i>L. major</i>)
Li72-23	F: TGCTTCATGATAACAACCTGGC R: TGTTTTGAATGGTGCCTGTT	50	(AC) 10, 8-16	6	
Li71-19	F: CAAACCGGTGTTCTGCTTTT R: CGGACATTGGCAACACACT	52	(CA) 13, 13-21	4	
Li71-60	F: GTGAGAAGGCAGGGATTCAA R: GCTGCAGCAGATGAGAAGG	46	(CA) 12, 8-13	5	Chr. 13 (<i>L. major</i>), RNS-Polymerase III-Gen
Li72-17/2	F: CTGTTTTACGCCCAACCATC R: CTTTTGGGATCGCAGGTTT	48	(CA) 13, 11-15	5	

Tab. 3: Mikrosatellitenprimerpaare (T_A: Annealingtemperatur; unter Repeats findet sich Art und Länge der Repeats beim klonierten Stamm PM1 sowie Längenbereich bei allen untersuchten Stämmen; bei Lokalisation ist die Spezies der Vergleichssequenz angegeben; * zu Li71-41 siehe Abb. 7)

Der Vergleich der Sequenzen aus Durchgang 1 und 2 mit der Datenbank führte weiterhin zu folgenden Ergebnissen: In Region Li13-5 fand sich im korrespondierenden *L. major*-Chromosom an Stelle eines (CA)-Repeats von mindestens 34 Bp Länge bei *L. infantum* lediglich ein kurzes, imperfektes Stück der Sequenz (CA)₃GA(CA)₂(CGCA)₂. In den drei übrigen Fällen war an entsprechender Stelle im *L. major*-Genom überhaupt kein Mikrosatellit vorhanden.

Das Primerpaar Li71-41 umschließt einen zusammengesetzten Mikrosatelliten. Hier kommt es bei den Stämmen aus Nordostafrika (Sudan, Äthiopien) und Kenia zu einer Deletion von sieben Basenpaaren sowie zu einer Punktmutation (Abb. 7)

Fragmentlänge	Sequenz
90 Bp	5' GATG CTCTTCT CTCTTCT CTCTTTT CTCTTTT CTCT 3'
83 Bp	5' GATG CTCTTCT CTCTTTCT CTCTTTT CTCT 3'

Abb. 7: Deletion und Punktmutation an Locus Li71-41

3.3 Nachweis von Polymorphismen in den Mikrosatellitenregionen

Die Amplifikation durch die in Tab. 3 beschriebenen Primer für die in Tab. 1 aufgeführten Stämme führte in jedem Falle zu einer oder zwei Banden. Die Fragmentlänge der PCR-Produkte wurde mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und nachfolgender Auswertung mittels Bionumerics-Software bestimmt (Abb. 8). Die mitaufgetragenen Amplifikate des klonierten Stammes MHOM/ES/93/PM1 mit bekannter Länge dienten als Referenz.

Anstelle der aufwendigen PAGE wurde die Elektrophorese in MetaPhor-Agarose (4 g/100 ml) versucht (Abb. 9). Die Auswertung der Bilder zeigte, dass eine eindeutige Längenbestimmung der aufgetragenen Fragmente wegen der Unschärfe der Banden nicht möglich war. Die prinzipielle Frage, ob ein Marker Polymorphismen aufweist, lässt sich aber auch mit dieser Methode beantworten.

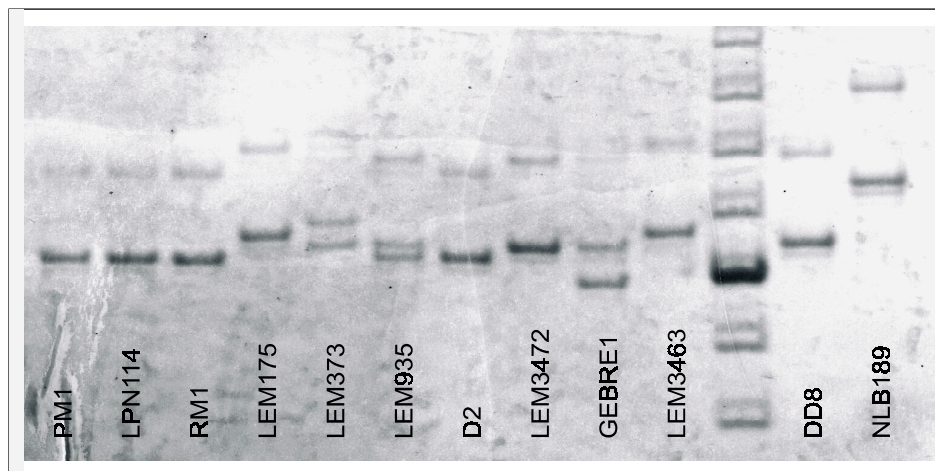


Abb. 8: Polyacrylamidgelelektrophorese (Locus 72-23, IPT1 nicht aufgetragen)

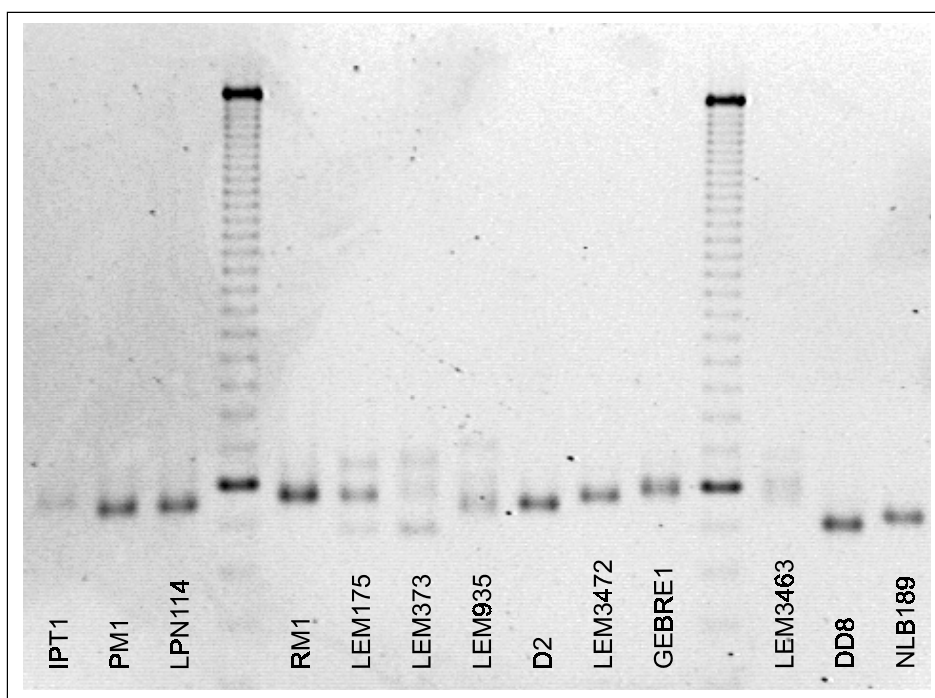


Abb. 9: Gelelektrophorese mit MethaPhor-Agarose (Locus Li72-20)

Anhand der bekannten Mikrosatellitensequenzen des klonierten Stammes wurde von der Fragmentlänge des PCR-Produkts auf die Anzahl der repetitiven Sequenzen in den untersuchten Stämmen geschlossen (Tab. 4, 5). Von den 15 untersuchten Markern sind

WHO-Code	Zymodem	Li21-34	Li22-35	Li23-41	Li45-24	Li51-40	Li71-33	Li71-5/2	Li71-41	Li71-42	Li72-14	Li72-20	Li72-23	Li71-19	Li71-60	Li72-17/2
1 MHOM/TN/80/IPT1	MON-1	93	102	83	107	94	105	81	90	106	92	95	104	112	98	126
2 MHOM/ES/93/PM1	MON-1	93	96	85	105	94	105	81	90	106	92	95	104	112	98	126
3 MHOM/FR/95/LPN114	MON-1	93	98	87	103	94	105	79	90	106	92	95	104	112	100	126
4 MCAN/FR/87RM1	MON-108	93	108	85	107	94	105	81	90	106	92	97	104	112	100	126
5 MHOM/ES/88/LEM175	MON-198	81	120	85	113	92	113/109	77	90	112	92	97/89	108	112	100	124
6 MHOM/ES/92/LEM373	MON-199	93/81	124/116	85	115/109	94/92	113/109	77	90	112	92	99/89	110/106	112	98	126/124
7 MCAN/ES/86/LEM935	MON-77	93/87	120	83	113/105	94	105	81	90	106	92	95/93	106/104	112	100	126
8 MHOM/CN/78/D2	LON-49	93	106	85	105	94	105	79	90	106	92	95	104	112	100	124
9 MHOM/SD/97/LEM3472	MON-267	89	102	97	111	90	103/99	81	83	102	88	97	106	128/126	94	128/122
10 MHOM/ET/72/GEBRE1	MON-82	89/79	84	95	111	88	99	79	83	106	88	99	106/100	126	94/92	122
11 MHOM/SD/97/LEM3463	MON-258	89/79	102	69	111	90/88	99	79	83	106	88	99/97	108	128	94	122
12 MHOM/IN/80/DD8	MON-2	79	100	115	97	88	103	79	90	102	92	89	106	118	90	130
13 MHOM/KE/83/NLB189	-	85	104	79	93	88	105	79	83	108	94	91	116	118	94	128

Tab. 4: Polymorphe Mikrosatellitenmarker für die untersuchten Stämme des *L. donovani*-Komplex; dargestellt ist die Größe des jeweiligen Markers in Bp.

WHO-Code	Zymodem	Li21-34	Li22-35	Li23-41	Li45-24	Li51-40	Li71-33	Li71-5/2	Li71-41	Li71-42	Li72-14	Li72-20	Li72-23	Li71-19	Li71-60	Li72-17/2
		(AC)	(CA)	(GT)	(AC)	(GT)	(TG)	(CA)	(CTCTT)T	(AC)	(TG)	(CA)	(AC)	(CA)	(CA)	(CA)
1	MHOM/TN/80/IPT1	9	17	15	16	9	11	9	4	9	10	13	10	13	12	13
2	MHOM/ES/93/PM1	9	14	16	15	9	11	9	4	9	10	12	10	13	12	13
3	MHOM/FR/95/LPN114	9	15	17	14	9	11	8	4	9	10	12	10	13	13	13
4	MCAN/FR/87RM1	9	20	16	16	9	11	9	4	9	10	13	10	13	13	13
5	MHOM/ES/88/LEM175	3	26	16	19	8	13/10	7	4	12	10	13/9	12	13	13	12
6	MHOM/ES/92/LEM373	9/3	28/24	16	20/17	9/8	13/10	7	4	12	10	14/9	13/11	13	12	13/12
7	MCAN/ES/86/LEM935	9/6	26	15	19/15	9	11	9	4	9	10	12/11	11/10	13	13	13
8	MHOM/CN/78/D2	9	19	16	15	9	11	8	4	9	10	12	10	13	13	12
9	MHOM/SD/97/LEM3472	7	17	22	13	7	10/8	9	3	7	8	13	11	21/20	10	14/11
10	MHOM/ET/72/GE BRE1	7/2	8	21	13	6	8	8	3	9	8	14	11/8	20	10/9	11
11	MHOM/SD/97/LEM3463	7/2	17	8	13	6/7	8	8	3	9	8	14/13	12	21	10	11
12	MHOM/IN/80/DD8	2	16	31	11	6	10	8	4	7	10	9	11	16	8	15
13	MHOM/KE/83/NLB189	5	18	13	9	6	11	8	3	10	11	10	16	16	10	14

Tab. 5: Polymorphe Mikrosatellitenmarker für die untersuchten Stämme des *L. donovani*-Komplexes; dargestellt ist die Anzahl der repetitiven Elemente.

zwölf in der Lage, unterschiedliche Subspezies von *L. infantum* zu differenzieren. Fünf davon weisen Polymorphismen innerhalb des Zymodems MON-1 auf.

Wie auch bei *L. viannia*-Spezies (Russel 1999) besteht eine hochsignifikante Rangkorrelation der Länge des Mikrosatelliten zur Anzahl der insgesamt gefundenen Allele ($r_{S,B}=0,699$; $P<0,01$; $n=15$) und zur Fragmentlängendifferenz zwischen längstem und kürzestem gefundenen Allel ($r_{S,B}=0,723$; $P<0,01$; $n=15$) sowie zwischen Allelzahl und maximaler Fragmentlängendifferenz innerhalb der Allele ($r_{S,B}=0,856$; $P<0,01$; $n=15$).

Es wurde bei der Auswahl der untersuchten Stämme darauf geachtet, einerseits mehrere Proben des vorherrschenden Zymodems bei *L. infantum* MON-1 und andererseits von jeder Subspezies des *L. donovani*-Komplexes wie auch jeder in Vergangenheit mit genotypischen Untersuchungsmethoden diskriminierten Untergruppe von *L. donovani* sensu stricto (El Tai 2001, Mauricio 2001, Lewin 2002) in die Analysen mit einzubinden. Bei zehn Mikrosatellitenloci traten Doppelbanden für einen oder mehrere der 13 ausgewählten Stämme auf, während die übrigen fünf bei sämtlichen untersuchten Stämmen nur ein Allel aufwiesen (Tab 4, 5). Es ist bemerkenswert, dass lediglich bei den spanischen Stämmen LEM175, LEM373, LEM935 und den Stämmen aus Nordostafrika (Sudan, Äthiopien) Doppelbanden beobachtet wurden.

Bei sieben perfekten Mikrosatelliten mit ausreichenden flankierenden Regionen wurde für insgesamt 200 wie auch für 300 Nukleotide um die repetitive Sequenz herum der durchschnittliche G/C-Gehalt bestimmt. Dieser liegt mit 48,33 - 57,33% unter dem des Leishmaniengesamtgenoms, welches mit 60 % angegeben wird (Alvarez 1994, *Leishmania* Genome Network, Ravel 1998). Eine Korrelation zwischen dem G/C-Gehalt der flankierenden Region und der Allelzahl beziehungsweise der maximalen Längendifferenz der gefundenen Allele, wie von Glenn (1996) und Brock (1999) beschrieben, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

3.4 Bestimmung der genetischen Verwandtschaft basierend auf der Analyse der Mikrosatellitenvariationen

Für die untersuchten Stämme wurde die genetische Distanz mit verschiedenen Methoden berechnet (‘Delta mu genetic distance’ D_{dm} (Goldstein 1995 a), ‘Average square distance’ D_1 (Goldstein 1995 b), ‘Proportion of shared alleles’ D_{ps} (Bowcock 1994) und ‘Nei’s standard distance’ D_s (Nei 1972)) und Dendrogramme mittels ‘Unweighted pair group method with arithmetic mean’ (UPGMA, Sneath 1973) und ‘Neighbour joining’ (NJ, Saitou 1987) erstellt (Abb. 10, übrige Daten nicht dargestellt). Während D_s und D_{ps} das klassische Mutationsmodell zu Grunde liegt, basiert die Berechnung von D_{dm} und D_1 auf der Theorie eines schrittweisen Mutationsprozesses (Moran 1975).

Die Einteilung der Stämme in Gruppen war für alle Dendrogramme mit Ausnahme einzelner abweichender Stämme gleich. Prinzipiell zeichnen sich zwei taxonomische Gruppen ab: Die erste beinhaltet *L. infantum*-Stämme aus Südeuropa sowie einen Stamm aus China und einen aus Tunesien. Die zweite Gruppe setzt sich aus nordostafrikanischen Stämmen zusammen zuzüglich des indischen Referenzstammes für *L. donovani*. Während die europäische Gruppe bei jeder Distanzberechnungsmethode und Darstellung eindeutig separiert ist, findet sich der *L. donovani*-Referenzstamm aus Indien bei NJ-Darstellung der D_s in einer Position zwischen den beiden Gruppen. Bei Bestimmung von D_1 und D_{dm} zeichnet sich eine Zwischengruppe mit MHOM/KE/83/NLB189 und MHOM/SD/97/LEM3463 ab. Innerhalb der europäischen Gruppe wird eine enge Beziehung zwischen LEM175 und LEM373 deutlich; bei der Berechnung von D_1 und D_{dm} findet sich zusätzlich noch LEM935 in dieser Subgruppierung aus spanischen Stämmen.

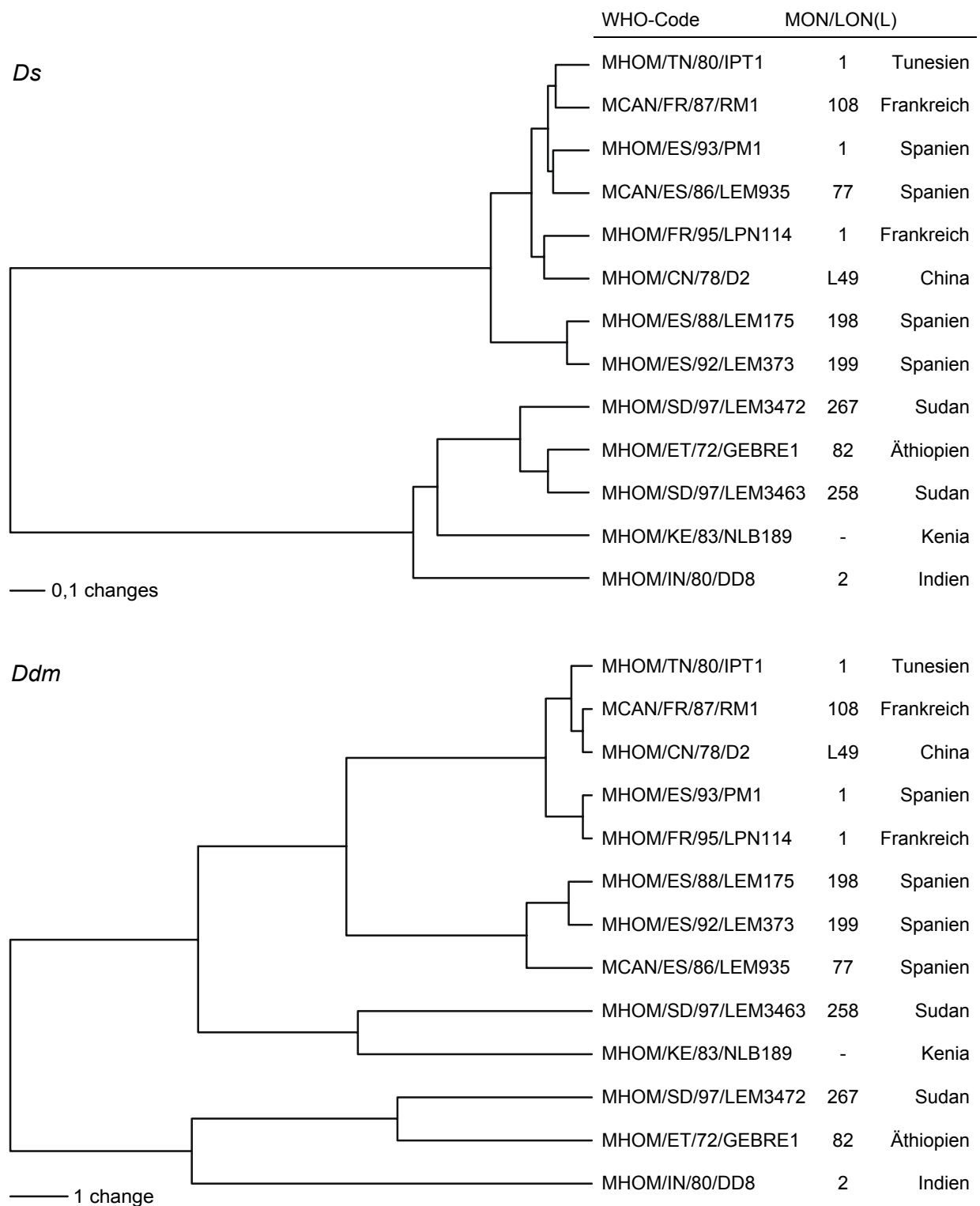


Abb. 10: Dendrogramme erstellt mit UPGMA nach Berechnung von *Ds* (Nei 1972) und *Ddm* (Goldstein 1995 a)

4 Diskussion

Zum ersten mal wurde mit 15 Primerpaaren ein für populationsgenetische oder epidemiologische Untersuchungen angemessener Satz von Mikrosatellitenmarkern für *L. d. infantum* entwickelt. Lediglich drei dieser Marker verhalten sich innerhalb von *L. d. infantum* monomorph (mit Ausnahme von LEM3472, dessen Stellung innerhalb des *L. donovani*-Komplexes umstritten ist), sind aber in der Lage, andere Spezies und Subspezies des *L. donovani*-Komplexes zu diskriminieren. Während bis jetzt lediglich drei unabhängige Mikrosatellitenmarker für *L. infantum* publiziert sind, die innerhalb von MON-1 differenzieren (Rossi 1994, Bulle 2002), trifft dies für fünf der hier vorgestellten Marker zu.

Verschiedene Mutationsmechanismen werden für die Entstehung eines Mikrosatelliten verantwortlich gemacht: Während zunächst eine Sequenz mit einigen wenigen repetitiven Elementen durch Punktmutationen erzeugt wird, führen fehlerhafte Anlagerungen der Polymerase bei der Replikation zu einer Verlängerung dieses Mikrosatelliten (Messier 1996). Ist eine gewisse Repeatlänge erreicht, stabilisieren Punktmutationen den Mikrosatelliten, indem sie die Bildung von Frameshift-Intermediaten verhindern oder diese so verändern, dass sie leichter erkannt und repariert werden können (Bichara 1995). Im Weiteren kommt es zur Deletion von ganzen Repeatverbänden, bis der Mikrosatellit als solcher kaum noch zu erkennen ist (Taylor 1999). Daher lassen sich bei unterschiedlichen Isolaten trotz großer genetischer Distanz Mikrosatelliten identischer Länge finden. Während sich bei einem Stamm die analysierte Sequenz in der Phase des Repeatzugewinns befinden kann, ist die andere möglicherweise in der Phase der Involution. Die zufällig identische Länge der Mikrosatelliten nennt man Homoplasie (Winter 1998). Dieses Phänomen verzerrt die auf Mikrosatellitenanalyse basierenden taxonomischen Verhältnisse und macht für populationsgenetische und taxonomische Studien die Verwendung von mindestens zehn unabhängigen Markern notwendig (Ruzzante 1998).

Es wird angenommen, dass die Größe des haploiden Gesamtgenoms von *Leishmania* in einem Bereich von 30 - 35 mio Bp anzusiedeln ist (Ivens 1998). Russel fand 1999 bei der Untersuchung von 3000 *Viannia*-Fragmenten im Größenbereich von 1000 bis 1500 Bp ohne vorherige Anreicherung lediglich 9 verschiedene (CA/GT)-Mikrosatelliten. Im günstigsten Falle wurden nach obiger Rechnung 5 - 10% des Gesamtgenoms untersucht. Man kann also annehmen, dass mindestens 90, wahrscheinlich aber sehr viel mehr (AC/GT)-Loci existieren (Russel 1999).

Geht man davon aus, dass die repetitiven Sequenzen bei *L. infantum* ähnlich verteilt sind, müsste bei einer Fragmentgröße von 400 - 1000 Bp im Schnitt etwa jede 600. Kolonie zuzüglich Redundanzen einen Mikrosatelliten enthalten. Daraus lässt sich annähernd auf die Effizienz der in dieser Arbeit vorgenommenen Anreicherung von Mikrosatellitensequenzen schließen: Während es im ersten und zweiten Durchgang ($T_{\text{hyb}} = 60^{\circ}\text{C}$, Artefakte durch freies 3'-Ende des $(\text{GT})_{10}$ -Oligonukleotids) zu einer Anreicherung um das 60- beziehungsweise 85fache kam, war in Durchgang 3 bei gleicher Hybridisierungstemperatur ($T_{\text{hyb}} = 60^{\circ}\text{C}$, blockiertes 3'-Ende des $(\text{GT})_{10}$ -Oligonukleotids) nur eine Anreicherung um Faktor 3,5 zu beobachten. Die Effizienz der Methode ließ sich durch die Absenkung von T_{hyb} um 5°C auf 55°C auf eine ca 190fache Anreicherung mit einem Anteil von über 30% positiven Kolonien signifikant steigern. Die Ergebnisse der ersten beiden Durchgängen lassen sich durch die Tendenz der Ligase erklären, bevorzugt kleinere Fragmente in den Vektor zu ligieren. Bei den dabei beobachteten Artefakten wurden nur Fragmente von 31 bis maximal 203 Bp gefunden statt der zu erwartenden durchschnittlichen Fragmentlänge von 350 Bp zuzüglich Adaptorsequenz.

Durch die Spezifität des Restriktionsenzym und die vorgenommene Größenselektion wurden große Teile des Genoms bei der Suche nach Mikrosatelliten nicht berücksichtigt. Das betrifft in diesem Fall schätzungsweise 60% des genetischen Materials. Um die Anzahl der Redundanzen zu verringern und größere Anteile des Genoms in eine genetische Bibliothek einzubinden, wäre eine Spaltung mit unterschiedlichen Enzymen (Hamilton 1999) und die Verwendung anderer, nicht Sau3A1-spezifischer Adapter notwendig (Jamjoom 2002 b).

Der hohe Anteil an Artefakten in den ersten beiden Durchgängen zeigt, dass von einer Verwendung von Oligonukleotiden mit freiem 3'-Ende dringend abzuraten ist. Bei Vektoren, die durch ein Restriktionsenzym geöffnet werden und die eine entsprechende Erkennungssequenz in den Adaptern voraussetzen, ist das Phänomen der Artefakt-

bildung gering, weil ein Fragmentende, das repetitive Elemente statt der Adaptorsequenz mit Restriktionsschnittstelle aufweist, nicht in den Vektor eingebaut werden kann (Hamilton 1999). Anders bei dem hier verwendeten offenen Vektorsystem mit U-Überhang: Hier wird jedes PCR-Produkt mit gleicher Effizienz ligiert; der Anteil an Artefakten im Ligationsansatz findet sich in vollem Umfang, wenn nicht sogar, bedingt durch die geringere Fragmentgröße, überrepräsentiert in der Bibliothek wieder.

Es empfiehlt sich, wie im Methodenteil beschrieben, das Verfahren des vierten Durchganges mit einer Biotinylierung am 3'-Ende zu verwenden und die Hybridisierungstemperatur zu optimieren.

Während die meisten der untersuchten Stämme in der Regel nur ein Allel pro Marker aufwiesen (ca 88% der Fälle), fanden sich bei sechs Stämmen Loci mit zwei Allelen. Dies kann mehrere Ursachen haben: Zunächst besteht die Möglichkeit eines Mischisolats, was sich nur durch das Klonieren des Stammes sicher ausschließen lässt. Ebenfalls denkbar ist, dass der analysierte Mikrosatellit zu einer ‚Multi-copy‘-Gensequenz gehört. Für *Leishmania* ist bekannt, dass kodierende Sequenzen mitunter tandemartig wiederholt werden, diese repetitiven Gene aber untereinander genetische Varianten (Isogene) aufweisen (Britto 1998). Dieses Phänomen kann ebenso Ursache der verschiedenen Allele sein wie das Vorliegen von Heterozygotie. Während bei heterozygoten Stämmen ein oder zwei Allele gefunden werden, sind bei Mikrosatelliten innerhalb von Isogenen auch mehr Allele pro Locus denkbar (Victoir 2002), was aber bei den hier untersuchten Stämmen nicht beobachtet wurde.

Zwei Allele an einem Locus finden sich in ca 12% der Fällen und ausschließlich in der spanischen Subgruppe (LEM175, LEM373, LEM935) sowie bei Stämmen aus dem nordöstlichen Afrika (Sudan, Äthiopien). Die Tatsache, dass hauptsächlich eine einzelne Bande beobachtet wird, spricht für Homozygotie in diesen Loci. Dieses wie auch die Korrelation zwischen voneinander unabhängigen genetischen Markern (Tibayrenc 1990) bestätigt die allgemein anerkannte These der asexuellen Fortpflanzung bei *Leishmania*. Dabei wird von einem selektiven Vorteil bei Fortpflanzung durch mitotische Rekombination ausgegangen, wobei zur Gewährleistung genetischer Vielseitigkeit Isogene angehäuft werden (Victoir 2002). Die Annahme, es handele sich bei MON-1 um einen ubiquitären, geographisch weit verbreiteten Genotypen (Tibayrenc 1990), ein weiteres Argument für die klonale Fortpflanzung von *Leishmania*, hat sich speziell durch Mikrosatellitenanalysen in dieser wie auch in anderen Arbeiten (Rossi 1994, Bulle 2002)

als nicht richtig erwiesen. Dass *Leishmania* einen Weg gefunden hat, die sexuelle Reproduktion zu umgehen, wurde durch Beobachtungen an wilden Populationen gezeigt (Dujardin 1995). Es ist bisher auch nicht gelungen, verschiedene Leishmaniastämme experimentell zu kreuzen, und die Häufigkeit sexueller Rekombination, sofern diese überhaupt auftritt, wird als sehr gering eingeschätzt (Panton 1991). Dagegen bemerkte Ashford (1992), dass *L. archibaldi* (MON-82) möglicherweise eine Heterozygote aus *L. infantum*, MON-30, und *L. donovani*, MON-18, darstellt und sich mit den Stämmen dieser Zymodeme bei einem Ausbruch im Sudan wie eine einzige Population verhielt. Die in dieser Studie gefundene Heterozygotie für *L. archibaldi* unterstützt diese Hypothese. Innerhalb der untersuchten Stämme zeichnen sich taxonomisch zwei große Gruppen ab, die nicht immer mit der auf Isoenzymmuster basierenden Unterteilung in *L. donovani* und *L. infantum* übereinstimmen. Speziell die Untergruppe der Stämme aus Nordostafrika, die sowohl den *L. infantum*-Stamm LEM3472 als auch die Stämme LEM3463 und GEBRE1, die beide auf Grund von den Ergebnissen der MLEE als *L. archibaldi*-Stämme geführt werden, beinhaltet, war bereits in der Vergangenheit problematisch hinsichtlich der korrekten taxonomischen Einordnung. Bei der Isoenzymanalyse hat sich eine sehr enge Verwandtschaft zwischen den Stämmen der Sudangruppe gezeigt, welche die Zymodeme MON-18 (*L. donovani*), MON-30 (*L. infantum*) und MON-82 (*L. archibaldi*) und verwandte Stämme umfasst (Rioux 1990, Pratlong 2001). Bei genotypischen Analyseverfahren verhalten sich die Stämme aus Nordostafrika unabhängig ihrer Spezieszuordnung durch die MLEE weitgehend als homogene Gruppe, die sich sowohl von den indischen *L. donovani*-Stämmen als auch von den *L. infantum*-Stämmen des mediterranen Beckens unterscheidet (Mauricio 2001, Ibrahim 2001, Oskam 1998). Während bei viszeraler Leishmaniose in Indien in 20% der Fälle mit einer Post-Kala Azar-dermalen Leishmaniose gerechnet werden muss (Thakur 1992), tritt diese bei *L. infantum* praktisch nicht auf (Guerbouj 2001, Cascio 2002, Minodier 2003). Hier bildet die Sudangruppe eine Ausnahme, denn hier wurde PKDL auch in Verbindung mit zu *L. archibaldi* eng verwandten *L. infantum*-Stämmen beobachtet (Zijlstra 1994, Pratlong 2001). Deshalb wurde von verschiedenen Autoren gefordert, die Zymodeme MON-30 (*L. infantum*) und MON-82 (*L. archibaldi*) entweder *L. donovani* sensu stricto zuzuordnen (Oskam 1998) oder zusammen mit MON-18 (*L. donovani* s. s.) in der Subspezies *L. d. archibaldi* zusammenzufassen (Mauricio 2001). Die Dreiteilung des *L. donovani*-Komplexes in anthroponotische *L. donovani* in Indien, *L. donovani* der Sudangruppe,

für die ein tierisches Reservoir vermutet wird, und *L. infantum* mit dem Reservoir Hund (Ibrahim 2001) lässt sich auch bei der Mikrosatellitenanalyse nachvollziehen. Mit den hier entwickelten Markern wurden in fast der Hälfte der Loci spezifische Allele für die Stämme aus der Sudangruppe nachgewiesen, die so eindeutig von allen übrigen Stämmen diskriminiert werden konnten. Innerhalb der *L. infantum*-Stämme aus Südeuropa, Tunesien und China zeichnet sich unabhängig von den verschiedenen Zymodemen bei der Mikrosatellitenanalyse eine enge Verwandtschaft ab. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Analysen mit Mikrosatelliten (Jamjoom 2002 b) und ‚Sequence-confirmed amplified region‘ (SCAR)-Markern (Lewin 2002). Dennoch bleibt zu zeigen, ob sich eine so nahe Verwandtschaft zwischen chinesischen und europäischen Stämmen auch bei einer aussagekräftigen Anzahl von Isolaten nachweisen lässt. Abgesehen von der Subgruppe der drei spanischen Stämme, die an einigen Loci Doppelbanden aufweisen, finden sich keine signifikanten Sprünge in der genetischen Distanz bei dieser Gruppe. Es hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass Mikrosatellitenmarker, die für eine Leishmanienspezies entwickelt wurden, nur begrenzt für andere einsetzbar sind. Mikrosatellitenloci, die bei *L. major* einen hohen Polymorphiegrad aufweisen, sind bei *L. donovani* in der Regel viel kürzer und häufig monomorph, sofern sie überhaupt zu einem Amplifikat führen (Jamjoom 2002 a). Umgekehrt zeigte sich in dieser Studie zumindest beim Vergleich mit den Sequenzen von *L. major* Friedlin aus der Datenbank, dass bei *L. infantum* Mikrosatelliten existieren, die bei *L. major* an entsprechender Stelle nicht oder nur als sehr kurze, imperfekte Repetitionen zu finden sind.

Anders verhält es sich innerhalb des *L. donovani*-Komplexes, also zwischen *L. donovani* und *L. infantum*. Hier wurde mehrfach gezeigt, dass Mikrosatellitenmarker ohne Probleme für die Analyse der beiden Spezies benutzt werden können (Jamjoom 2002 a, Jamjoom 2002 b). Auch in dieser Studie waren alle für *L. infantum* entwickelten Mikrosatellitenmarker auch bei *L. donovani* amplifizierbar. Innerhalb der untersuchten *L. donovani*-Stämme waren meist größere Differenzen in der Fragmentlänge der einzelnen Repeats zu beobachten als bei den *L. infantum*-Stämmen. Das lässt sich darauf zurückführen, dass *L. donovani* sensu stricto mehrere taxonomische Subgruppen umfasst, also genetisch sehr viel heterogener ist als *L. infantum*.

Es konnte keinerlei signifikante Rangkorrelation zwischen G/C-Gehalt und Länge oder Variabilität des Mikrosatelliten festgestellt werden wie beispielsweise bei Glenn (1996) für (GT/AC)-Repeats beschrieben. Die prinzipielle Annahme einer negativen Korrelation

zwischen diesen Größen, auch speziell bei diesem repetitiven Element, ist also nicht zulässig, vor allem da auch in anderen Studien hier keine Signifikanzen nachgewiesen werden konnten (Balloux 1998, Ellegren 2000 a). Die Analyse der die Mikrosatelliten flankierenden Sequenzen (200 - 300 Bp) ergab, dass der G/C-Gehalt um die hier untersuchten Loci immer unter dem bei *Leishmania* gefundenen Durchschnittswert liegt (*Leishmania* Genome Network, Ravel 1998).

Über den Anteil an Mikrosatelliten mit ‚multi-step changes‘ (genereller Zugewinn oder Verlust von 2 - 5 repetitiven Elementen statt einem einzelnen, Ellegren 2000 a) konnte auf Grund zu weniger untersuchter Stämme keine Aussage gemacht werden.

Für Aussagen zur Taxonomie ist die Untersuchung einer weit größeren Anzahl von Stämmen notwendig. Nur so ist zu entscheiden, ob die hier entwickelten Mikrosatellitenmarker für solche Analysen ausreichend sind. Insbesondere bei Stämmen des Zymodems MON-1 ist eine höhere Probenzahl erforderlich, um zu klären, ob noch weitere Mikrosatellitenmarker entwickelt werden müssen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch die Testung der für *L. donovani* publizierten Mikrosatellitenmarker (Jamjoom 2002 b).

Die Mikrosatellitenanalyse hat gegenüber anderen genotypischen Verfahren zur taxonomischen Differenzierung eindeutige Vorteile: Sie ist in der Lage, Stämme der gleichen Spezies sehr viel feiner zu diskriminieren als jede andere bisher beschriebene Methode. Bei einer ausreichend großen Anzahl von Markern spiegelt sie die tatsächliche Verwandtschaft wieder. Eine Automatisierung der Fragmentlängenanalyse mittels Sequenzierer ist bereits für *L. tropica* -Mikrosatellitenmarker etabliert (Schwenkenbecher, persönliche Mitteilung), was die Untersuchung von großen Probenzahlen ermöglicht. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass Mikrosatellitensequenzen direkt aus klinischen Proben ohne vorherige Kultivierung des Erregers amplifiziert werden können, was von großem Vorteil für umfangreiche epidemiologische Studien wäre.

Ein Problem ist sicherlich, dass die Marker speziesspezifisch sind, und deshalb die vom *Leishmania major*-Genomprojekt publizierten Sequenzen nicht für andere Leishmaniarten genutzt werden können. Das in dieser Arbeit beschriebene optimierte Verfahren zur Etablierung von angereicherten Mikrosatellitenbibliotheken hilft jedoch, den Entwicklungsaufwand der Marker entscheidend zu verringern.

Mit dem hier entwickelten Satz von Markern könnte es gelingen, eine gänzlich neue Einteilung innerhalb von *L. infantum* auf Grundlage des Genotyps vorzunehmen, im Sinne von ‚Mikrodemen‘ als Äquivalent zu den Zymodemen (Isoenzymanalyse) oder Serodemen (Monoklonale Antikörper), wie unter anderem von Russel (1999) gefordert.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Mikrosatellitenmarker für epidemiologische, phylogenetische und populationsgenetische Untersuchungen bei *Leishmania d. infantum* zu entwickeln und die zu Grunde liegende Methodik so zu etablieren, dass sie problemlos für andere Parasiten- und auch Wirtspezies angewandt werden kann.

Zur Erstellung einer angereicherten Mikrosatellitenbibliothek wurde ein publiziertes Protokoll für einen mediterranen *L. infantum*-Stamm adaptiert. Die Anreicherung erfolgte mittels magnetischer Dynabeads und biotinylierter Mikrosatellitensonden. Bei der Durchsuchung der Bibliothek auf positive Klone konnte auf eine Hybridisierung verzichtet werden; statt dessen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, bei der zusätzlich zu dem spezifischen Primerpaar ein der Mikrosatellitensequenz entsprechendes Oligonukleotid zugesetzt wurde. Bei Mikrosatelliten enthaltenden Kolonien zeigte sich in der anschließenden Elektrophorese eine Doppelbande. Die positiven Klone wurden sequenziert und an Hand der erhaltenen Sequenz Primerpaare entwickelt. Die PCR-Bedingungen wurden mit der DNS des ursprünglich klonierten Stammes optimiert. Polymorphismen in den Mikrosatellitenloci wurden bei 13 Stämmen des *L. donovani*-Komplexes nach Amplifizierung und Bestimmung der Größe des Mikrosatellitenmarkers nachgewiesen. Insgesamt wurden 15 polymorphe Marker entwickelt, von denen fünf auch bei *L. infantum*-Stämmen des Zymodems MON-1 Unterschiede aufwiesen. In den meisten früheren Studien konnte keine Differenzierung innerhalb der MON-1-Gruppe erreicht werden; bisher sind lediglich drei Marker publiziert, die bei diesen Stämmen polymorph sind.

Bei der Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von 13 Stämmen des *L. donovani*-Komplexes war eine grundlegende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse und anderen genotypischen Verfahren der taxonomischen Diskriminierung sowie der Isoenzymanalyse zu beobachten: Die Spezies *L. infantum* und *L. donovani* waren weitgehend von einander abgrenzbar. Es ließ sich aber klar eine Untergruppe differenzieren, welche die Stämme aus dem Sudan und Äthiopien zusammenfasst, und zwar unabhängig davon, ob sie von der Isoenzymanalyse als *L. donova-*

ni, *L. infantum* oder *L. archibaldi* indentifiziert worden waren; die Stämme aus Kenia und Indien wiesen Unterschiede zu dieser Gruppe auf. Dieser Befund muss jedoch durch die Untersuchung weiterer Stämme aus diesen Regionen geprüft werden.

Es ist gelungen, ein Verfahren zu etablieren, mit dem in kurzer Zeit mit relativ geringem Aufwand eine mit Mikrosatelliten hoch angereicherte Genbibliothek für jede beliebige Spezies erstellt und auf positive Klone durchsucht werden kann.

Mit den in dieser Studie entwickelten Markern steht erstmalig ein für populationsgenetische Studien bei *L. infantum* ausreichend großer Satz an Mikrosatellitenmarkern zur Verfügung. In Kombination mit anderen, früher entwickelten Markern sollte die Einteilung von *L. d. infantum*, aber auch die des gesamten *L. donovani*-Komplexes in Mikrodeme nun möglich sein. Damit wird einerseits die Möglichkeit für epidemiologische Studien bei *L. infantum* verbessert und andererseits ein Mittel zur Revision der Taxonomie des *L. donovani*-Komplexes geschaffen.

6 Literatur

- 1) Alvar, J., Jimenez M. (1994): Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs?. *AIDS* **8**: 854
- 2) Alvarez, F., Robello, C., Vignali, M. (1994): Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoa. *Molecular Biology and Evolution* **11**, 790-802
- 3) Ashford, R. W., Seaman, J. et al. (1992): Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patientes and vectors. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **86**: 379-380
- 4) Ashford, R. W. (2000): The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology* **30**: 1269-1281
- 5) Bichara, M., Schumacher, S., Fuchs, R. P. P. (1995): Genetic instability within monotonous runs of CpG sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* **140**: 897-907
- 6) Bloor, P. A., Barker, F. S. et al. (2001) : Microsatellite libraries by enrichment, <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/genomics.html>
- 7) Bowcock, A. M., Ruíz-Linares, A. et al. (1994): High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**: 455-457
- 8) Britto, C. (1998): Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* **222**: 107-117

- 9) Brock, G. J. R., Anderson, N. H., Monckton, D. G. (1999): *Cis*-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Human Molecular Genetics* **8**: 1061-1067
- 10) de Bruijn, M. H. L., Barker, D. C. (1992): Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica* **52**: 45-58
- 11) Bulle, B., Millon, L. et al. (2002): Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3391-3397
- 12) Cascio, A., Colomba, C. et al. (2002): Pediatric visceral leishmaniasis in Western Sicily, Italy: A retrospective analysis of 111 cases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**: 277-282
- 13) Corredor, A., Kreutzer, R. D. et al. (1990): Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **42**: 206-214
- 14) Crow, J. F. (1993): How much do we know about spontaneous human mutation rates?. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **21**: 122-129
- 15) Cupolillo, E., Grimaldi, J. G. et al. (1995): Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**: 145-155
- 16) Desjeux, P. (2001): The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**: 239-243
- 17) Dujardin, J. C., Dujardin J. P. et al. (1995 a): Karyotype plasticity in neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. *Parasitology* **110**: 21-30

- 18) Dujardin, J. C., Banuls, A. L. et al. (1995 b): Putativ *Leishmania* hybrids in the Easter Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta tropica* **59**: 293-307
- 19) Eisenberger, C. L., Jaffe, C. L. (1999): *Leishmania*: Identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology* **91**: 70-77
- 20) Ellegren, H. (2000 a): Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**: 551-558
- 21) Ellegren, H. (2000 b): Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics* **24**: 400-402
- 22) El Tai, N. O., El Fari, M. et al. (2001): *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Experimental Parasitology* **97**: 35-44
- 23) van Eys, G. J. J. M., Schoone, G. J. et al. (1992): Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* **51**: 133-142
- 24) Fernandes, O., Murthy, V. K. et al. (1994): Mini-exon variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* **66**: 261-277
- 25) le Fichoux, Y., Quaranta, J. F. et al. (1999): Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1953-1957
- 26) Field, D., Wills, C. (1996): Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London* **263**: 209-215

- 27) Gillis, D., Klaus, S. et al. (1995): Diffusely disseminated cutaneous *Leishmania major* infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatric Infectious Disease Journal* **14**: 247-249
- 28) Glenn, T. C., Stephan, W. et al. (1996): Allelic diversity in Alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 1151-1154
- 29) Goldstein, D. B., Ruiz-Linares, A. et al. (1995 a): Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **92**: 6720-6727
- 30) Goldstein, D. B., Ruiz-Linares, A. et al. (1995 b): An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* **139**: 463-471
- 31) Gragg, H., Harfe, B. D., Jinks-Robertson, S. (2002): Base composition of mononucleotide runs affects DNA polymerase slippage and removal frameshift intermediates by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 8756-8762
- 32) Grimaldi, G., David, J. R., McMahon-Pratt, D. (1987): Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**: 270-287
- 33) Guerbouj, S., Guizani, I. et al. (2001): Genomic polymorphism of *Leishmania infantum*: a relationship with clinical pleomorphism?. *Infection, Genetics and Evolution* **1**: 49-59
- 34) Hamilton, M., Pincus, E. et al. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* **27**: 500-507

- 35) Harris, E., Kropp, G. et al. (1998): Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 1989-1995
- 36) Herwaldt, B. L. (1999): Seminar Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191-1199
- 37) Heyer, E., Puymirat, J. et al. (1997): Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Human Molecular genetics* **6**: 799-803
- 38) Ho, J. W. C., Yuen, S. et al. (2000): Distinct clinical features associated with microsatellite instability in colorectal cancers of young patients. *International Journal of Cancer (Pred. Oncol.)* **89**: 356-360
- 39) Ibrahim, M. E., Barker, D. B. (2001): The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infection, Genetics and Evolution* **1**: 61-68
- 40) Ivens, A. C., Lewis, S. M. et al. (1998): A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Research* **8**: 135-145
- 41) Jamjoom, M. B., Ashford, R. W. et al. (2002 a): Polymorphic microsatellite repeats are not conserved between *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. *Molecular Ecology Notes* **2**: 104-106
- 42) Jamjoom, M. B., Ashford, R. W. et al. (2002 b): Towards a standart battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **96**: 265-270
- 43) Jimenez, M. I., Guttierrez-Solar, B. et al. (1991): Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Res Rev Parasitol* **51**: 91-94

- 44) Karplus, T. M., Jeronimo, S. M. B. et al. (2002): Association between the Tumor Necrosis Factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infection and Immunity* **70**: 6919-6925
- 45) Kebede, A., De Doncker, S. et al. (1999): Size-polymorphism of mini-exon gene-bearing chromosomes among natural populations of *Leishmania*, subgenus *Viannia*. *International Journal of Parasitology* **29**: 549-557
- 46) Killick-Kendrick, R. (1990): Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* **4**: 1-24
- 47) Koblízková, A., Dolezel, J., Macas, J. (1998): Subtraction with 3' modified oligonucleotides eliminates amplification artifacts in DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* **25**: 32-38
- 48) Kokozidou, M. (2003): Dissertation: Evaluation of PCR methods for detection, species identification and determination of genetic variation in *L. infantum*. Justus-Liebig-Universität, Giessen
- 49) Kroutil, L. C., Register, K. et al. (1996) : Exonucleolytic proofreading during replication of repetitive DNA. *Biochemistry* **35**: 1046-1053
- 50) Lawes, D. A., SenGupta, S., Boullos, P. B. (2003): The clinical importance of microsatellite instability in sporadic cancer. *European Journal of Surgical Oncology* **29**: 201-212
- 51) Lewin, S., Schönian, G. et al. (2002): Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *International Journal of Parasitology* **32**: 1267-1276
- 52) Lumsden, W. H. R. (1974): Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **68**: 74-75

- 53) Mauricio, I. L., Stothard, J. R., Miles, M. A. (2000): The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* **16**: 188-199
- 54) Mauricio, I. L., Gaunt, M. W. et al. (2001): Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* **122**: 393-403
- 55) Messier, W., Li, S., Stewart, C. (1996): The birth of microsatellites. *Nature* **381**: 483
- 56) Minodier, P., Piarroux, F. et al. (1997): Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2551-2555
- 57) Minodier, P., Retornaz, K. et al. (2003): Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **17**: 183-188
- 58) Moran, P. A. P. (1975): Wandering distributions and the electrophoretic profile. *Theoretical Population Biology* **8**: 318-330
- 59) Moreno, G., Rioux, J. et al. (1986): Le complexe *Leishmania donovani* s.l.. *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques, Montpellier 105-117
- 60) Nei, M. (1972): Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292
- 61) Noyes, H. A., Belli, A. A., Maingon, R. (1996): Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**: 98-105

- 62) Noyes, H. A., Reyburn, H. et al. (1998): A nested-PCR-based schizodeme method for identifying leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its applications to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 2877-2881
- 63) Orita, M., Wahana, H. et al. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* **86**: 2760-2770
- 64) Oskam, L., Pratlong, F. et al. (1998): Biochemical and molecular characterization of *Leishmania* parasites isolated from an endemic focus in eastern Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **92**: 120-122
- 65) Panton, L. J., Tesh, R. B. et al. (1991): A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Protozoology* **38**: 224-228
- 66) Pratlong, F., Dedet, J. P. et al. (1995): *Leishmania*-Human Immunodeficiency Virus coinfection in the Mediterranean basin: Isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *Journal of Infectious Diseases* **172**: 323-326
- 67) Pratlong, F., J. Dereure, J. et al. (2001): Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology* **122**, 599-605
- 68) Quispe, W., Ying, X. et al.: Antigen genes for molecular epidemiology of Leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase b and gp63 in the *Leishmania donovani* complex. in Press
- 69) Ravel, P., Debussay, P. and the *Leishmania* Genome Network (1998): The complete chromosomal organization of the reference strain of the *Leishmania* Genome Project, *L. major* 'Friedlin'. *Parasitology Today* **14**: 301-303

- 70)Refseth, U. H., Fangan, B. M. et al (1997): Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis* **18**: 1519-1523
- 71)Rioux, J., Lanotte, G. et al.(1985): L'électrophorèse des enzymes dans le genre *Leishmania* Ross, 1903. *Parassitologia* **27**: 141-156
- 72)Rioux, J., Lanotte, G. et al. (1990): Taxonomy of *Leishmania*. Use of Isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **65**: 111-125
- 73)Rodrigues Coura, J., Galvao-Castro, B. et al. (1987): Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82**: 581-582
- 74)Rossi, V., Wincker, P. et al. (1994): Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)(n) loci. *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**: 271-282
- 75)Rozen, S., Skaletsky, H. J. (1998): Primer3. Code unter <http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/primer3.html>
- 76)Russel, R., Iribar, M. P. et al. (1999): Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **103**: 71-77
- 77)Ruzzante, D. E. (1998): A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **55**: 1-14
- 78)Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425
- 79)Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning*. New York

- 80)Schönian, G., Schweynoch, C. et al. (1996): Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* **77**:19-29
- 81)Schönian, G., Schnur, L. et al. (2001): Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**: 217-224
- 82)Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973): *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco
- 83)Taylor, J. S., Durkin, J. M. H., Breden, F. (1999): The death of a microsatellite. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 567-572
- 84)Thakur, C. P., Kumar, K. (1992): Post kala-azar dermal leishmaniasis: a neglected aspect of kala-azar control programmes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **86**: 355-359
- 85)Tibayrenc, M., Kjellberg, F. et al. (1990): A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **87**: 2414-2418
- 86)Velasco, O., Savarino, S. J. et al. (1989): Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **41**: 280-288
- 87)Victoir, K., Dujardin, J. C. (2002): How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in Parasitology* **18**: 81-85

- 88)Weber, J. L., Wong, C. (1993): Mutation of short tandem repeats. Human Molecular Genetics **2**: 1123-1128
- 89)Wiese, M., Kuhn, D., Grünfelder, C. G. (2003): Protein kinase involved in flagellar-length control. Eucaryotic Cell **2**: 769-777
- 90)Winter, P. C., Hickey, G. I., Fletcher, H. L. (1998): Instant notes in genetics, Oxford
- 91)Yoshida, E. L. A., Correa, F. M. A. et al. (1990): Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in the south-west region of Sao Paulo state. Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **85**: 133-134
- 92)Zijlstra, E. E., El-Hassan, A. M. et al. (1994): Endemic Kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study of the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala azar dermal leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **51**: 826-836

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel sind ebenso wie die verwendete Literatur vollständig angegeben.

Berlin, 30. 1. 2004

Sebastian Hertweck